

Über die Entwicklung von spezifischen
und hochempfindlichen instrumentellen Analysenverfahren
für die toxikologische und forensische Chemie

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Venia legendi
an der Universität Zürich

vorgelegt im April 1969 von
HANS BRANDENBERGER
von Zürich

Leiter der Chemischen Abteilung
am Gerichtlich-medizinischen Institut
der Universität Zürich

1970

Einleitung

Die vergangenen fünfzehn Jahre haben Zielsetzung und Methodik der chemisch-toxikologischen und forensischen Analytik grundlegend verändert. Während man sich früher meist mit der Auffindung von tödlichen oder hochtoxischen Giftstoffen zufriedengeben mußte und nur selten neben dem Nachweis des zugeführten Giftstoffes auch dessen metabolisches Bild zu reproduzieren versuchte, will man heute auch die in geringen «Normaldosen» im Körper vorkommenden potentiellen Giftstoffe qualitativ und quantitativ erfassen und sowohl bei nicht toxischer wie auch bei toxischer Dosierung ihre Verteilung im Körper, ihren metabolischen Einbau (Koppelung), Umbau oder Abbau, sowie den Ausscheidungsmechanismus verfolgen.

Eine solche Zielsetzung stellt hohe Anforderungen an die chemische Analytik. Neben hochleistungsfähigen Trennverfahren, die auch im Mikro- und Submikro-Maßstab eingesetzt werden können, sind hochempfindliche Identifikationsmethoden mit großer Aussagekraft erforderlich. Einzelne Komponenten müssen sich voneinander trennen und mit absoluter Sicherheit identifizieren lassen, auch wenn nur Millionstelgramme, in gewissen Fällen sogar nur Billionstelgramme davon vorhanden sind. Erschwerend wirkt dabei für den Analytiker die exponentiell ansteigende Zahl potentieller Giftstoffe, mit denen sich der Mensch konfrontiert sieht zufolge des stets wachsenden Angebotes an Pharmaka, der in immer vermehrtem Maße und in ständig neuen Formen eingesetzten Pestizide, der steigenden Gefahren der Kontamination mit giftigen Gasen, Lösungsmitteln, reaktionsfähigen chemischen Zwischenprodukten, chemischen Zusatzstoffen und Abfallprodukten unserer Zivilisation. Die Zahl der vom Toxikologen nachzuweisen Verbindungen ist heute so groß geworden, daß man mit vergleichender Analytik allein nicht mehr zum Ziele kommt. Die moderne analytische Methodik muß in der Lage sein, auch uns bisher völlig unbekannte Giftstoffe zu erfassen und in ihrer Struktur aufzuklären.

Dank den chemisch-analytischen Neuentwicklungen der letzten fünfzehn Jahre, die zum großen Teil instrumenteller Natur sind, können die vorerwähnten Anforderungen heute vielfach erfüllt werden. Auf dem Gebiete der Stofftrennung haben die chromatographischen Verfahren, insbesondere die Gaschromatographie, eine neue Dimension eröffnet. Für Identifikationszwecke sind eine Anzahl hochempfindliche und hochspezifische spektrometrische Verfahren entwickelt worden, von denen insbesondere die Ultraviolett- und Infrarot-Analyse, die Fluoreszenz-Spektrophotometrie sowie die Massenspektrometrie für die toxikologische Analytik wertvoll geworden sind. Im anorganischen Sektor, das heißt auf dem Gebiete des Nachweises von Metallen und Halbmetallen, steht die kaum ein Jahrzehnt alte atomare Absorptionsanalyse heute bereits im Vordergrund.

Die analytischen Entwicklungen sind aber nicht etwa abgeschlossen. Einige der Verfahren (Infrarot-Analyse, zum Teil auch atomare Absorption) sollten zur Lösung gewisser toxikologischer Fragen noch empfindlicher sein. Dann sind insbesondere im Hinblick auf eine kontinuierliche Kombination von Trennmethoden mit Identifikationsverfahren Hürden zu überwinden.

Im folgenden soll an zwei Beispielen gezeigt werden, wie wir uns an diesen analytischen Entwicklungen beteiligen. Die erste Arbeit beschreibt eine Weiterentwicklung der atomaren Absorptionsanalyse. Durch Ersatz der Flamme, die üblicherweise als Atomisierungsmittel eingesetzt wird, durch ein von uns konzipiertes flammenloses Verfahren, ist es möglich, die Empfindlichkeit der Methode für einige toxikologisch wichtige Metalle um mehrere Zehnerpotenzen zu verbessern. Die zweite Arbeit ist der Gaschromatographie gewidmet. Dieses hochleistungsfähige Trennverfahren hat an und für sich wenig Identifikationskraft. Wir zeigen, wie durch Einsatz verschiedenartiger, teils semispezifischer Detektoren, sowie durch die multi-massenspezifische Detektion dieser Nachteil behoben werden kann, unter gleichzeitiger Senkung der Nachweisgrenzen in den Picogramm-Bereich (10^{-12} g).



Empfindlichkeitssteigerung der atomaren Absorptionsanalyse mittels flammenloser Atomisierung*

Von H. BRANDENBERGER

Chemische Abteilung, Gerichtlich-medizinisches Institut Universität Zürich

Summary

After a brief discussion of the basic principles of atomic absorption analysis, the disadvantages of the flame as atomizer and absorption cell are outlined. Some flameless atomization methods previously published, namely hollow cathode sputtering (WALSH), thermic atomization in a high temperature furnace (L'VOV), and sample boat technique (KAHN *et al.*) are reviewed.

In contrast, the author's approach incorporates an isolation step. The metal of interest is coated onto a wire and released as an atomic vapor in the beam of an absorption spectrometer by heating the sample wire with an electric current. This is particularly simple for the analysis of mercury in solution. The metal is sampled by spontaneous amalgamation or electrolysis on copper, and the atomic vapor released in an absorption cell. The concentration of mercury in solution is calculated from the absorption, by the vapor cloud, of a mercury resonance line.

Other metals can also be determined with the same approach, provided that they can be deposited on a sample wire and released as a mono-atomic vapor. So far, experiments have been successful with cadmium, zinc, lead, thallium, copper, silver, gold and platinum. In these cases, a platinum or tungsten sampling wire must be used. A "free sample wire" and an "enclosed sample wire" method are described. In the former, a coated platinum spiral is placed in the light beam of the spectrometer without using a cell. The absorption signal is produced mainly by the vapor within the heated spiral. In the latter, the coated sample wire (tungsten can be used) is placed in a silica cell before atomization. An argon atmosphere is recommended. Both techniques require a fast recording system, since the vapor cloud diffuses and condenses rapidly. The "free sample wire" method has the advantage of extreme simplicity. The "enclosed sample wire" technique, on the other hand, has a greater potential for control and adaption. It might be developed, by using a heated cell, to a static vapor method.

Some sensitivities and detection limits are given (Fig. 26). Compared with flame absorption, they are improved by factors of 10^2 to 10^4 . Analyses in the parts per trillion range are feasible.

Die atomare Absorptionsanalyse wurde 1955 als Laboratoriumsverfahren konzipiert¹. 1960, in Europa erst 1963, kamen die ersten kommerziellen Analysengeräte auf den Markt. Heute ist das Verfahren bereits eine der wichtigsten, wenn nicht die führende Methode auf dem Gebiete des Nachweises von Metallen und Halbmetallen.

*Vortrag, gehalten am 11. September vor der Gesellschaft Schweizerischer Mikroanalytiker, anlässlich des 2. Schweizerischen Treffens für Chemie, ILMAC 1968, in Basel.

¹ A. WALSH, *Spectrochim. Acta* 7 (1955) 108-17.

Die Schnelligkeit dieser Entwicklung wird wohl nur von derjenigen der gaschromatographischen Analyse übertroffen. Sie ist bedingt durch:

1. den breiten Anwendungsbereich der atomaren Absorptionsanalyse, welche gestattet, gegen siebzig Elemente auf einfache Weise nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen,
2. die hohe Spezifität und relativ geringe Störanfälligkeit des Verfahrens, die in vielen Fällen zeitraubende Vortrennungen und Isolationen erübrigen,
3. die für eine ansehnliche Zahl wichtiger Metalle sehr günstig liegenden Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen.

Grundlagen der Flammenabsorptionsanalyse

Die Grundlagen der atomaren Absorptionsanalyse sind von verschiedenen Autoren eingehend besprochen worden, wobei fast ausnahmslos auf die bahnbrechenden Arbeiten von WALSH¹ zurückgegriffen wurde. Hier sollen die wichtigsten Punkte lediglich mit Hilfe einiger Figuren und Tabellen zusammengefaßt werden.

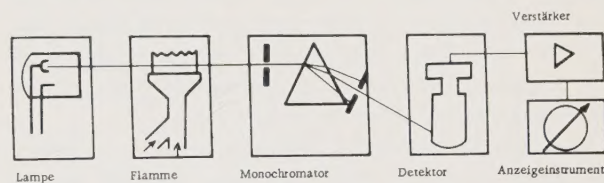


Abb. 1. Prinzipschema eines Atomabsorptions-Spektrophotometers nach WALSH

Abb. 1 zeigt das Prinzipschema der Methode: Ein die Resonanzlinien des zu erfassenden Elementes emittierender Strahler, meist eine Hohlkathodenlampe oder eine Dampfentladungslampe, sendet sein scharf ausgeblendetes Licht durch einen atomaren Dampf und einen Monochromator auf einen Detektor. Dessen Signal wird verstärkt und durch ein Galvanometer oder einen Potentiometerschreiber registriert. Wie in der molekularen Spektrophotometrie mißt man die Konzentration der zu bestimmenden Population (hier ein atomarer Dampf, dort meist eine Lösung von Molekülen oder Molekular-

ionen) an der durch sie bewirkten Lichtschwächung. Fast durchwegs, so z.B. in allen kommerziell erhältlichen Instrumenten, wird der Dampf des zu bestimmenden Elementes dem Lichtstrahl in einer Flamme dargeboten; das Analysengut wird also wie in der Flammenemissionsanalyse von einer Flamme versprüht, verdampft und elementar dissoziiert. Das ist der Grund, daß man im deutschen Sprachgebiet meist nicht von atomarer Absorptionsanalyse, sondern von Flammenabsorptionsanalyse spricht und die Parallelen zur Flammenemissionsanalyse überbetont.

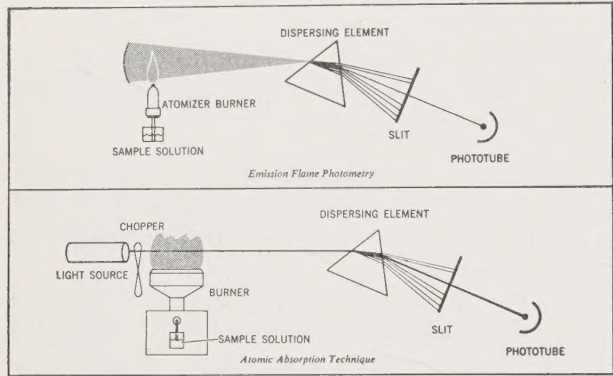


Abb. 2. Schematischer Vergleich von Flammenemission und Flammenabsorption

Abb. 2 zeigt, daß Flammenabsorption und Flammenemission prinzipiell verschiedene Verfahren sind. In der Emissionsanalyse wird das von der Flamme ausgesandte Licht gemessen. Nur die thermisch angeregten Atome lassen sich so erfassen, nicht die Atome im Grundzustand. In der Absorptionstechnik stammt das Licht von einem Strahler und wird meist moduliert, z.B. durch einen Chopper. Ein auf die Chopper-Frequenz eingestellter Wechselstromverstärker sorgt dafür, daß nur das Lampenlicht und nicht dasjenige der Flamme registriert werden kann. Die Lichtschwächung erfolgt durch die Atome im Grundzustand. Thermische Anregung ist nicht nur unnötig, sondern unerwünscht.

Aus Abb. 3 geht hervor, daß das Absorptionsverfahren ein ökonomischeres Analysenprinzip darstellt als das Emissionsverfahren. Auch in heißen Flammen bleibt nämlich die Zahl der thermisch angeregten Atome im Verhältnis zur Zahl der Atome im Grundzustand sehr klein. So gilt z.B. für die 5890-Ångström-Resonanzlinie

Resonance lines	$\frac{N_j}{N_0}$ $T = 2000^\circ\text{K}$	$T = 3000^\circ\text{K}$	$T = 4000^\circ\text{K}$	$T = 5000^\circ\text{K}$
Cs 8521 Å	4.44×10^{-4}	7.24×10^{-3}	2.98×10^{-2}	6.82×10^{-2}
Na 5890 Å	9.86×10^{-6}	5.88×10^{-4}	4.44×10^{-3}	1.51×10^{-2}
Ca 4227 Å	1.21×10^{-7}	3.69×10^{-5}	6.03×10^{-4}	3.33×10^{-3}
Zn 2139 Å	7.29×10^{-15}	5.58×10^{-10}	1.48×10^{-7}	4.32×10^{-6}

Abb. 3. Verhältnis der Atomzahl im angeregten Zustand N_j zum Grundzustand N_0 für die Hauptresonanzlinie von vier Elementen bei verschiedenen absoluten Temperaturen, nach WALSH¹

von Natrium bei 3000°K, was einer gebräuchlichen Flammentemperatur entspricht, daß auf 1700 Atome im Grundzustand nur ein einzelnes im betreffenden angeregten Zustand vorhanden ist. Für die 2139-Ångström-Resonanzlinie von Zink liegen die Verhältnisse noch viel krasser; hier treffen auf ein angeregtes Atom 1 800 000 000 Atome im Grundzustand.

AA-Nachweisgrenzen in wässriger Lösung

- A) besser als 0,1 p.p.m. = 23 Elemente:
Mg, Zn, Cd, Cu (0,005)
Li, Na, K, Rb, Cs, Ca, Sr,
Ag, Au, Cr, Mn, Fe, Ni; **Be**
- B) 0,1 p.p.m. bis 1 p.p.m. = 21 Elemente:
Ba, Mo, Co, Pt, Pd, Hg, Tl,
Sn, Pb, As, Sb, Bi; **Al, V**
- C) 1 p.p.m. bis 30 p.p.m. = 14 Elemente:
B, Si, Ge, Zr, La, W, U

Abb. 4. Nachweisgrenzen der wichtigsten mit Flammenabsorptionsanalyse bestimmbar Elemente. Für die im Druck hervorgehobenen Elemente ist der Einsatz einer Lachgasflamme notwendig

In Abb. 4 sind die wichtigsten mit Flammenabsorptionsanalyse bestimmbar Elemente angeführt, gruppenweise geordnet nach Nachweisgrenzen. Die Tabelle enthält nicht alle heute erfassbaren Elemente, es sind bereits nahezu siebzig. Dazu werden einige wenige kommen, die sich der Methode bisher lediglich in Ermangelung eines Resonanzstrahlers entzogen haben. Auf die typischen Nichtmetalle hingegen, also auf die gasförmigen Elemente, dann auch Phosphor und Schwefel, läßt sich das Verfahren deshalb nicht anwenden, weil deren Absorptionslinien unter 1800 Ångström liegen. Nur ein Übergang zu Vakuumsystemen, verbunden mit Elimination der Flamme als Probekammer, könnte hier Abhilfe schaffen.

Die mit atomarer Absorptionsanalyse erreichbaren Nachweisgrenzen sind insbesondere für die Elemente Magnesium, Zink, Cadmium und Kupfer bemerkenswert, nämlich unter 0,005 p.p.m. in wässriger Lösung. Für die unterstrichenen sogenannten refraktären Elemente, die stark zur Oxidbildung neigen, werden nur mit stark reduzierend wirkenden und heißen Flammen brauchbare Resultate erzielt. Man verwendet in diesen Fällen mit Vorteil Lachgas als Sauerstofflieferant. Für

einige Elemente, wie die Alkalien, Bor oder Thallium, ist die Nachweisempfindlichkeit der Flammenabsorptionsanalyse nur etwa gleichwertig wie für die Flammenemission. Das erstaunt, denn auf Grund der vorgehend demonstrierten Verhältniszahlen der Atome im angeregten und Grundzustand würde man auch in diesen Fällen von der Absorptionsmethode mehr erwarten.

Nachteile der Atomisierung in Flammen

Das Prinzip der Atomisierung in Flammen hat seinen dominierenden Platz in der atomaren Absorptionsanalyse wohl hauptsächlich dem Umstand zuzuschreiben, daß es nicht erst entwickelt werden mußte. Es konnte mit wenig Modifikationen einfach aus der Flammenemissionsanalyse übernommen werden. Doch wurde schon frühzeitig darauf hingewiesen, daß Flammen keine idealen Behälter für atomare Dämpfe sind. Von ihren Nachteilen möchten wir hervorheben:

1. die Nichtuniformität dieser Art Absorptionskammer,
2. die durch den Flammenuntergrund bewirkte Lichtschwächung,
3. die schlechte Ausbeute des physikalischen Verdampfungsvorganges,
4. die vielen Möglichkeiten für das Auftreten chemischer Reaktionen, welche die atomare Ausbeute drastisch erniedrigen können,
5. die Tatsache, daß das Analysengut der Flamme über eine bestimmte Zeitdauer kontinuierlich dargeboten werden muß und verbraucht wird, was die absolute Empfindlichkeit des Verfahrens gewaltig verschlechtert,
6. die Tatsache, daß das Analysengut durch die Flammengase enorm verdünnt wird,
7. die Abwesenheit einer bekannten Beziehung zwischen Konzentration eines Elementes in Lösung und Konzentration seiner freien Atome in der Dampfphase.

Flammenlose Atomisierungsprinzipien sind deshalb von mehreren Autoren vorgeschlagen und zum Teil auch getestet worden. Hier soll nur auf diejenigen eingegangen werden, für die analytische Resultate vorliegen.

Atomisierung mittels Hohlkathoden-«Sputtering»

Abb. 5 veranschaulicht ein von WALSH und Mitarbeitern² schon 1960 beschriebenes Verfahren. Es ist insbesondere für die Untersuchung von Metallen gedacht. Diese werden hohlzylindrisch geformt und als Kathode in eine aufklappbare Hohlkathodenlampe eingesetzt. Die Bildmitte zeigt diese rohrförmige Lampe mit den beiden Quarzfenstern für den Durchtritt von Resonanzlicht des zu erfassenden Elementes. Bringt man die Analysengut-Hohlkathode zum Glühen, so entsteht im Zy-

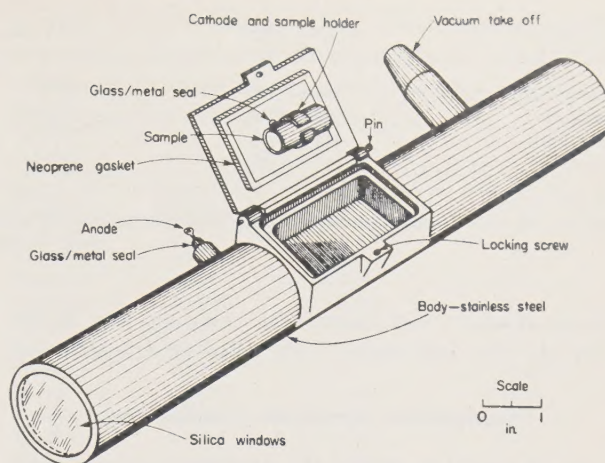
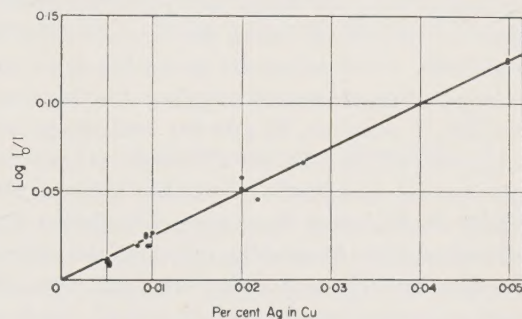


Diagram of sputtering chamber



Calibration curve for the determination of silver in copper

Abb. 5. Flammenlose Atomisierung mittels Hohlkathoden-«Sputtering», nach RUSSELL und WALSH². Zeichnung = rohrförmiges Hohlkathodenaggregat mit Quarzfenstern, Hohlkathodenhalterung ausklappbar zum Einsetzen der zylindrisch geformten Metallproben. Darunter Kalibrationskurve für die Bestimmung von Silberspuren in Kupfer

linderinneren durch das sogenannte «Sputtering» ein atomarer Dampf, der das durchgestrahlte Licht schwächen kann. Die Kurve im unteren Bildteil zeigt, daß die Extinktion linear ansteigt mit dem Gehalt des zu bestimmenden Elementes im Kathodenmaterial.

Neben Silber in Kupfer haben WALSH und Mitarbeiter mit ihrem System auch Aluminium in Zink sowie Silicium in Aluminium und Stahl bestimmt. Da in inerte Atmosphäre gearbeitet wird, können sich refraktäre Elemente der analytischen Erfassung nicht durch Oxidbildung entziehen. Metalle lassen sich direkt analysieren, doch muß berücksichtigt werden, daß nur ihre Oberfläche der Verdampfung ausgesetzt ist und daß darum nur mit homogenen Proben korrekte Resultate erreicht werden können.

Abb. 6 zeigt die Resultate einer Meßreihe von GOLEB und BRODY³. Diese haben 1963 die Atomisierung mittels «Sputtering» für die Analyse von Flüssigkeiten eingesetzt. 0,1 ml Salzlösung wurde auf einer Kathodenoberfläche eingedampft und in der Kathodenlampe zum Verdampfen gebracht. Die Autoren berechneten für die Elemente Magnesium, Calcium, Beryllium und Silicium

² B. J. RUSSELL und A. WALSH, *Spectrochim. Acta* 10 (1959) 883-5; B. M. GATEHOUSE und A. WALSH, *Spectrochim. Acta* 16 (1960) 602-4.

³ J. A. GOLEB und J. K. BRODY, *Anal. Chim. Acta* 28 (1963) 457-66.

Element	Lower limit	Wavelength of line used (Å)	Compound used in absorption tube
Magnesium	Appr. 1 µg	2852.1	Magnesium chloride
Calcium	Appr. 1 µg	4226.7	Calcium chloride
Beryllium	Appr. 1 µg	2348.6	Beryllium chloride
Silicon	Appr. 1 µg	2881.6	Sodium metasilicate

Abb. 6. Absolute Nachweisgrenzen für die Bestimmung von Metallen aus Lösung durch Atomisierung mittels Hohlkathoden-«Sputtering», nach GOLEB und BRODY³

untere absolute Nachweisgrenzen von 1 µg, was, in Anbetracht des Aufwandes, nicht allzu eindrücklich ist.

Flammenlose thermische Atomisierung

Die flammenlose thermische Atomisierung wurde insbesondere von L'vov⁴ bearbeitet. Abb. 7 zeigt seinen Hochtemperaturofen, ein innen mit einer Tantalfolie ausgekleidetes Graphitrohr, durch das der analysierende Lichtstrahl tritt. L'vov erhielt die besten Resultate mit 100 mm langen Rohren von 3 mm innerem Durchmesser, die er auf 2200 °C aufheizte. Er gibt das Analysengut auf eine Kohlelektrode und dampft eventuell vorhandenes Lösungsmittel ab. Unmittelbar beim Einführen in das Rohr erfolgt Atomisierung durch einen Lichtbogen. Die plötzlich entstehende Atomwolke schwächt das durchtretende Resonanzlicht und diffundiert weg. Das Absorptionssignal steigt deshalb plötzlich steil an, um dann langsamer abzufallen. Nur eine Registrierung über die Zeit gestattet, die maximale Absorption zu messen. Arbeit in Argonatmosphäre verlangsamt die Diffusion und erleichtert die Meßtechnik, verhindert zudem die Bildung refraktärer Oxide.

Das Verfahren wurde von MASSMANN⁵ übernommen und modifiziert. Auch er verwendet einen offenen Graphitrohrofen mit Argonspülung, verdampft das Analysengut jedoch lediglich durch die elektrische Widerstandsheizung, die das Rohr in wenigen Sekunden auf

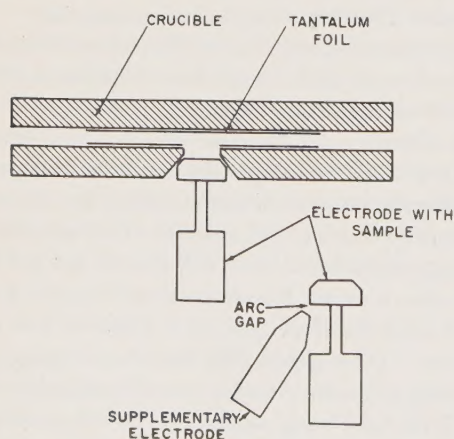


Abb. 7. Hochtemperatur-Graphitofen für die flammenlose thermische Atomisierung, nach L'vov⁴

⁴ B.V. L'VOV, *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 761–70.

⁵ H. MASSMANN, *Spectrochim. Acta* 23 B (1968) 215–26.

2600 °C bringt. Um die durch die Matrix bedingte Untergrundabsorption zu eliminieren, empfiehlt MASSMANN hauptsächlich für niedrige Wellenlängen die gleichzeitige Messung und Subtraktion des Signals an einer benachbarten Wellenlänge ohne Resonanzabsorption. Dazu benötigt man natürlich ein Spektrophotometer mit zwei photoelektrischen Kanälen.

	Nachweisempfindlichkeiten nach L'vov	Nachweisgrenzen nach MASSMANN
Mn	$2 \cdot 10^{-10}$ (4030)	$8 \cdot 10^{-12}$ (2795)
Pb	$1 \cdot 10^{-8}$ (4057)	$1 \cdot 10^{-11}$ (2833)
Tl	$5 \cdot 10^{-10}$ (5350)	$4 \cdot 10^{-11}$ (2768)
Li	$5 \cdot 10^{-11}$ (6707)	
Sr	$2 \cdot 10^{-11}$ (4607)	
Ba	$1 \cdot 10^{-10}$ (5535)	
Mg		$5 \cdot 10^{-13}$ (2852)
Zn		$8 \cdot 10^{-13}$ (2139)
Ag		$8 \cdot 10^{-13}$ (3281)

Abb. 8. Nachweisempfindlichkeiten bzw. Nachweisgrenzen bei der flammenlosen thermischen Atomisierung, in g (absolut) nach L'vov⁴ und MASSMANN⁵

In Abb. 8 sind einige von L'vov 1961 und von MASSMANN 1968 publizierte Zahlen über Empfindlichkeit bzw. Nachweisgrenzen des Verfahrens reproduziert. Es handelt sich um ganz erstaunlich niedrige Werte. Die Diskrepanz zwischen den beiden Autoren rührt wohl hauptsächlich davon her, daß der erstere aus apparativen Gründen nicht die intensivsten Resonanzlinien benutzen konnte. Waren ihm diese zugänglich, wie beim Lithium, Strontium und Barium, so lassen sich seine Werte ebenfalls sehen. Die besten Nachweisgrenzen gibt MASSMANN für die Elemente Magnesium, Zink und Silber an, nämlich rund 1 Picogramm.

Gemessen an solchen Zahlen ist es erstaunlich, daß sich flammenlose thermische Verdampfungsmethoden noch nicht in der atomaren Absorptionsanalyse eingebürgert haben. Vielleicht ist das durch folgende Nachteile dieser Systeme bedingt:

1. Größere Lösungsvolumen lassen sich nicht analysieren. MASSMANN verwendet z. B. nur 5 bis 200 µl.
2. Das Absorptionssignal ist abhängig von der Matrix des Analysengutes, die nicht mehr als wenige µg betragen soll. 50 µg Kochsalz z. B. täuschen durch «Scattering» bereits ein Absorptionssignal von 0,2 vor.

3. Punkt 1 und 2, in Kombination, verunmöglichen eine Anwendung der Methode auf die Spurenanalyse verdünnter komplexer Systeme, wie es biologische Flüssigkeiten sind.
4. Die apparativen Aufwendungen sind beträchtlich und die experimentellen Bedingungen nicht leicht unter Kontrolle zu halten.

«Sampling boat»-Technik

Auf der Suche nach einem ganz einfachen Verdampfungssystem haben KAHN und Mitarbeiter 1968⁶ die sogenannte «Sampling boat»-Technik entwickelt. Die Analysenlösung, maximal 1 ml, wird in ein Tantal-Schiffchen pipettiert. Dieses wird gegen die Laminarflamme eines gewöhnlichen Flammenabsorptions-Spektrophotometers zubewegt, wobei das Lösungsmittel verdampft. Ist das Analysengut eingetrocknet, so wird das Boot direkt in die Flamme geschoben. Rasche und praktisch verlustfreie Atomisierung erfolgt und wird mit einem schnellen elektronischen System zeitlich registriert.

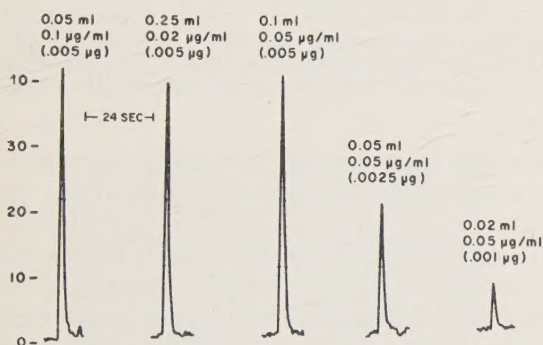


Abb. 9. Silberbestimmungen mit der «Sampling boat»-Technik nach KAHN *et al.*⁶. $\lambda = 3282 \text{ \AA}$, dreifache Ordinatenendehnung

Abb. 9 zeigt eine Meßreihe mit Silberlösungen. Ein Signal erstreckt sich über etwa 4 Sekunden. Die drei Meßwerte links zeigen, daß ihre Höhe abhängt von der Absolutmenge des vorgelegten Silbers, nicht von dessen Konzentration in der ursprünglichen Lösung wie bei der Flammenabsorption. Die drei Meßwerte rechts demonstrieren, daß die Höhe der Signale proportional ist zum Silbergehalt der Probe.

Abb. 10 gibt eine Übersicht über die Elemente, die KAHN und Mitarbeiter mit ihrer «Sampling boat»-Technik bisher analytisch bestimmt haben. Die erhaltenen Nachweisgrenzen werden verglichen mit denjenigen der Flammenabsorptionsanalyse. Sie liegen zwischen 5- und 65 mal tiefer. Das Verfahren ist noch neu und wenig erprobt. Als Schwierigkeiten wurden beschrieben:

- allzu schnelle Verdampfung sowie Hintergrundabsorptionseffekte bei der Bestimmung von Quecksilber,
- Störungen durch Hintergrundabsorption und Lichtstreuung bei der Analyse von Urin.

Element	Boat	Nebulizer	Improvement
Arsenic	0.02	0.1	5 ×
Bismuth	0.003	0.05	16 ×
Cadmium	0.0001	0.002	20 ×
Lead	0.001	0.03	30 ×
Mercury	0.02	0.5	25 ×
Selenium	0.01	0.1	10 ×
Silver	0.0001	0.005	50 ×
Tellurium	0.01	0.3	30 ×
Thallium	0.001	0.025	25 ×
Zinc	0.00003	0.002	65 ×

Abb. 10. Nachweisgrenzen der «Sampling boat»-Technik in $\mu\text{g/ml}$, nach KAHN *et al.*⁶. Vergleich mit Versprühung in Flamme (*nebulizer*)

Eigene Entwicklungen

a) Bestimmung von Quecksilber

Wir selber sind auf der Suche nach einem flammenlosen Atomisierungsprinzip einen anderen Weg gegangen. Da wir hauptsächlich an der Analyse biologischer Proben interessiert sind, haben wir zum vornherein den Einsatz eines Isolier- bzw. Anreicherungsverfahrens in unsere Untersuchungen einbezogen. Ursprünglich waren diese lediglich auf die Spurenanalyse des Quecksilbers ausgerichtet, da uns dieses Element bei der Analyse biologischer Proben am meisten Schwierigkeiten bereitete.

Zwei Verfahren wurden entwickelt, ein dynamisches und ein statisches⁷. In beiden isolieren wir das in saurer Lösung vorliegende Quecksilber erst durch Amalgamierung an einer Kupferdrahtspirale und setzen es dann im Strahlengang eines Absorptionsspektrometers durch Ohmsche Erwärmung frei.

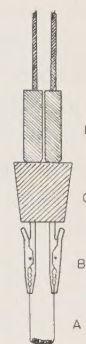


Abb. 11. Drahtspirale mit Halterung für die Amalgamierung von Quecksilber auf Kupfer sowie für die elektrolytische Abscheidung anderer Elemente. A = Drahtspirale (Kupfer, Platin, Wolfram), B = Krokodilklemmen, C = Stopfen, D = Bananenstecker

Abb. 11 zeigt die Drahtspirale mit Halterung, die wir verwenden. Die Amalgamierung kann spontan erfolgen oder elektrolytisch gefördert werden. Für die spontane Abscheidung von 100 bis 150 Nanogramm Quecksilber aus 5 oder 10 ml Lösung sind bei guter Rüh-

⁶ H. L. KAHN *et al.*, *Atomic Absorption Newsletter* 7 (1968) 35–9.

⁷ H. BRANDENBERGER und H. BADER, *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 1409–15.

nung 2 bis 3 Stunden notwendig. Eine Gleichspannung von 3 Volt verkürzt den Vorgang auf 15 Minuten. Die beladene Kupferspirale wird in eine Absorptionskammer eingesetzt, die sich im Lichtweg des Spektrophotometers befindet.

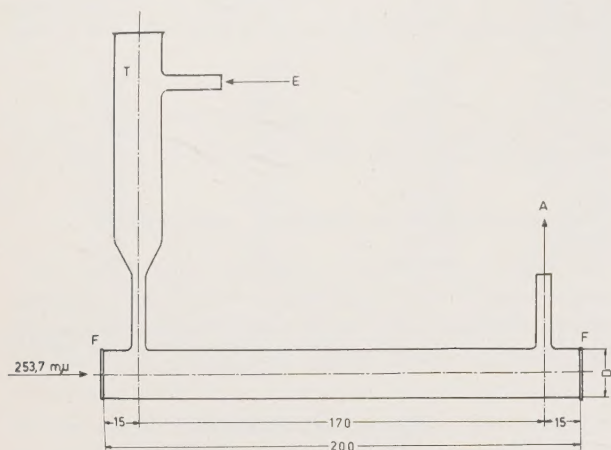


Abb. 12. Absorptionsrohr für die Bestimmung von Quecksilber nach dem dynamischen Verfahren. F = Quarzfenster mit Durchmesser D , T = Trichter zum Einführen der Probedrahtspirale, E = Gaszufuhrrohr, A = Gasabsaugrohr

Abb. 12 illustriert die Absorptionszelle, die wir in unserem ersten, dynamischen Verfahren^{8,9} benutzten: ein Glasrohr mit zwei Quarzfenstern, ein trichterförmiger Ansatz zur Aufnahme der Spirale sowie Ansatzstutzen für den Ein- und Austritt eines Gasstromes. Durch Anlegen einer Spannungsdifferenz an den beiden Drahtenden wird die Kupferspirale zum Glühen gebracht und dabei das Quecksilber fast momentan atomar verdampft. Ein geregelter konstanter Gasstrom zieht die Dampf- wolke durch das Absorptionsrohr, während die Schwächung der 2537-Ångström-Quecksilberlinie zeitlich registriert wird. Abb. 13 zeigt vier solche Signale. Es handelt sich um je zwei Doppelbestimmungen von 130 ng Quecksilber bei verschiedenem Durchmesser des Absorptionsrohres, logarithmisch registriert. Die Abszisse repräsentiert die Zeitachse mit Vorschub nach links, die Ordinate die Extinktionsskala. Der spezifische Ausschlag sinkt mit dem Quadrat des Rohrdurchmessers. Verwendet man aber zu enge Rohre, so schwächt man die Lichtintensität des Strahlers. Auch die optimale Einstellung des Gasstromes wird dann schwieriger.

Abb. 14 ist eine Kalibrationskurve für Quecksilbermengen bis 150 Nanogramm. Es handelt sich wiederum um direkt logarithmisch aufgezeichnete Extinktionswerte, die proportional dem Quecksilbergehalt der analysierten Lösung sind. Für geringere Quecksilbermengen greifen wir zu einer zehnfachen Dehnung der Extink-

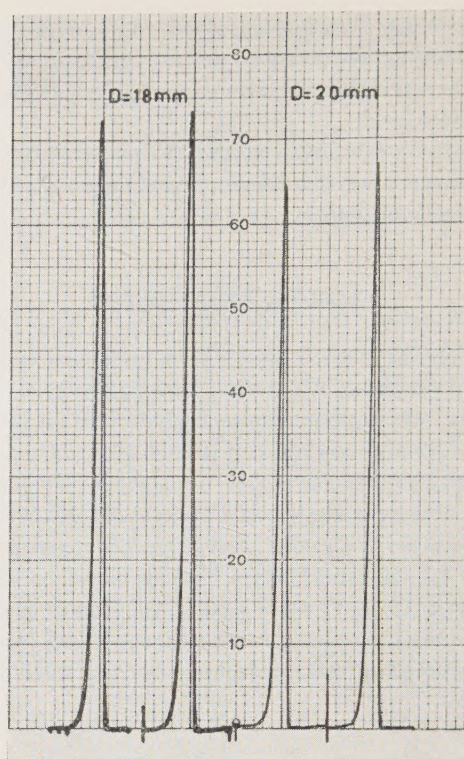


Abb. 13. Doppelbestimmungen von je 130 ng Quecksilber bei verschiedenem Durchmesser D des Absorptionsrohres. $\lambda = 2537 \text{ Å}$, Extinktion logarithmisch registriert ohne Ordinaten- dehnung, Zeitachse mit Vorschub nach links, Signaldauer etwa 15 sec

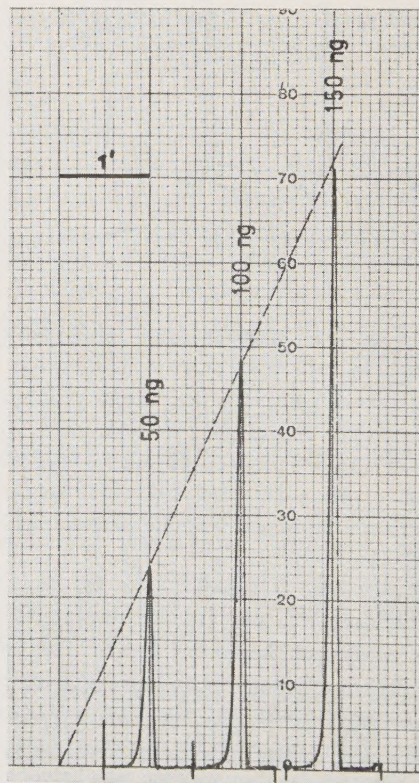


Abb. 14. Kalibrationskurve für die Bestimmung von Quecksilber aus wässriger Lösung nach dem dynamischen Verfahren. $\lambda = 2537 \text{ Å}$, Extinktionswerte direkt logarithmisch registriert, Vorschub nach links

⁸ H. BRANDENBERGER, *Ann. Biol. Clin.* 25 (1967) 1053–62.

⁹ H. BRANDENBERGER und H. BADER, *Atomic Absorption Newsletter* 6 (1967) 101–3.

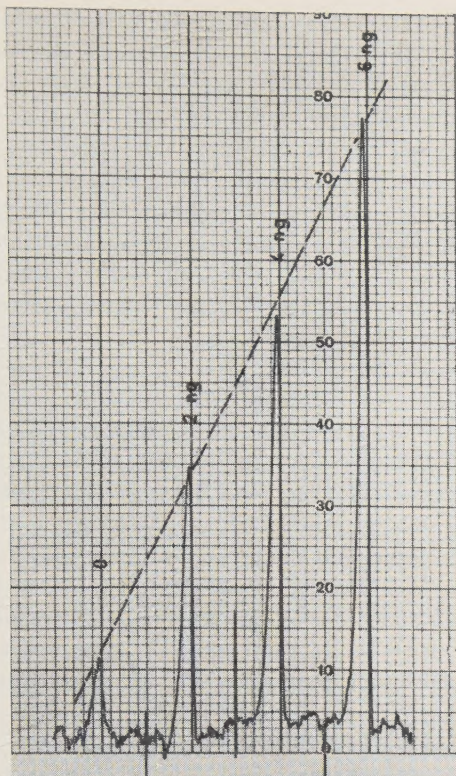


Abb. 15. Kalibrationskurve für die Bestimmung von Spuren-Quecksilber-Gehalten nach dem dynamischen Verfahren. $\lambda = 2537 \text{ \AA}$, mit zehnfacher Ordinatendehnung linear registriert, Vorschub nach links

tionsskala, wie in Abb. 15 dargestellt. Die Registrierung erfolgt dann linear, und 0,2 ng Quecksilber können noch erfaßt werden.

Eine etwas einfachere Messung des Quecksilberdampfes ist das statische Verfahren^{10, 11}, das wir etwas später beschrieben haben. Es kann auch ohne Registriermöglichkeit benutzt werden. Abb. 16 zeigt die geschlossene Absorptionszelle, die wir hierzu verwenden, mit kurzem Mittelstutzen zum Einsetzen der beladenen Spirale und Absaugrohr mit Hahn. Der atomare Dampf wird in gleicher Weise erzeugt wie im dynamischen Verfahren,

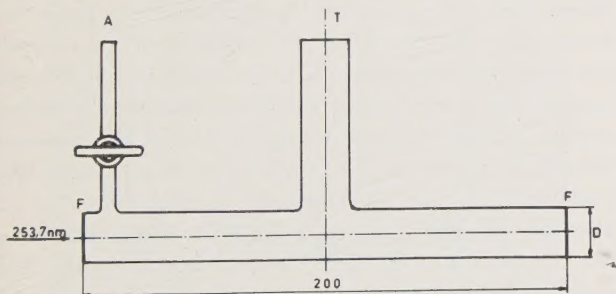


Abb. 16. Absorptionsrohr für die Bestimmung von Quecksilber nach dem statischen Verfahren. F = Quarzfenster mit Durchmesser D, T = Trichter zum Einführen der Probedrahtspirale, A = Absaugrohr

¹⁰ H. BRANDENBERGER und H. BADER, *Atomic Absorption Newsletter* 7 (1968) 53–4.

¹¹ H. BRANDENBERGER und H. BADER, *Chimia* 21 (1967) 597–8.

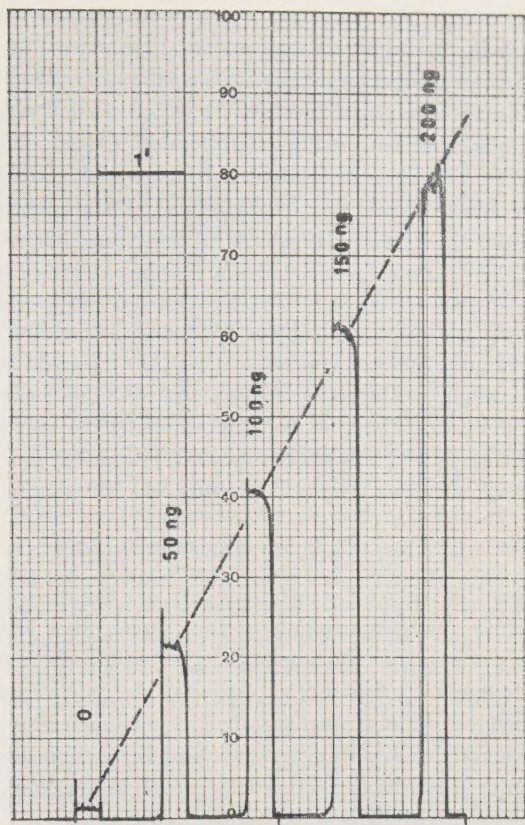


Abb. 17. Kalibrationskurve für die Bestimmung von Quecksilber aus wässriger Lösung nach dem statischen Verfahren. $\lambda = 2537 \text{ \AA}$, Extinktionswerte direkt logarithmisch registriert, Zeitachse mit Vorschub nach links

aber im Rohr festgehalten, bis seine Konzentration ermittelt worden ist. Dann erst saugt man ihn ab, um eine Kontamination des Gefäßes zu verhindern. Abb. 17 ist eine mit diesem Verfahren ermittelte Kalibrationskurve für Quecksilbermengen bis 200 ng. Man kann hier auch lediglich die Galvanometerauslässe ablesen oder mit einem Digitalanzeigergerät arbeiten.

Die spezifischen Ausschläge von dynamischem und statischem Verfahren halten sich die Waage. Abb. 18 faßt den quantitativen Arbeitsbereich zusammen: 2 ng Quecksilber lassen sich noch mit 3% Fehler, 0,2 ng mit 10% Fehler bestimmen. Der Linearitätsbereich erstreckt sich über drei Zehnerpotenzen. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist 10000 mal besser als mit Flammenabsorptionsanalyse.

Die hohe Empfindlichkeit und Einfachheit unseres Verfahrens eröffnen neue Möglichkeiten für die medi-

Skalen- dehnung	ng Hg für 1% Vollaus- schlag	Meßbereich in ng Hg	Nachweis- grenze in ng Hg	Reproduzier- barkeit %
ohne	2	2–200	2	± 3
10fach	0,1	0,2–10	0,2	± 10

Abb. 18. Empfindlichkeit, Meßbereich, Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeit der Quecksilberbestimmung ab Probedraht

zinisch-chemische Diagnostik. Seit über einem Jahr setzen wir die Methode erfolgreich ein für die Bestimmung des Quecksilbergehaltes menschlicher Urinproben. Die Amalgamierung kann direkt aus dem Urin erfolgen. Damit wird nicht nur der zeitraubende Aufschluß umgangen, sondern auch die damit oft verbundenen Quecksilberverluste sowie die Gefahr einer Kontaminierung. Normale Urin-Quecksilbergehalte betragen höchstens wenige Nanogramm pro ml. Ab 10 ng pro ml spricht man bereits von einer Intoxikation. Wie leicht kann aber eine solche kleine Quecksilbermenge bei einem Aufschluß eingeschleppt oder verloren werden? Bei der Quecksilberbestimmung in anderen biologischen Materialien, wie Blut oder Organen, ist es deshalb nur noch der Aufschluß des Materials, der uns Sorge bereitet, nicht mehr die Abtrennung und analytische Erfassung des Metalles.

b) Ausdehnung auf weitere Elemente

Nach den guten Erfahrungen mit der flammenlosen atomaren Absorptionsanalyse von Quecksilber haben wir versucht, unser Verfahren auch auf andere Elemente auszudehnen. Es hat sich gezeigt, daß das mit Metallen möglich ist, die sich kathodisch oder anodisch abscheiden lassen und die bei der Ohmschen Erhitzung monoatomar verdampfen, nicht aber mit Elementen, die polyatomare Dämpfe liefern¹¹.

Das letztere konnten wir demonstrieren am Beispiel von Arsen und Antimon. Beide lassen sich spontan oder

elektrolytisch auf Kupfer abscheiden. Auch werden beim Erhitzen der beladenen Spiralen Dampf Wolken frei, die das eingestrahlte Licht einer Arsen- bzw. Antimon-Hohlkathodenlampe schwächen. Abb. 19 zeigt das am Beispiel einer Arsenanalyse bei 1937 Ångström. 2,5 und 5 µg Arsen wurden in Lösung vorgelegt und konnten so erfaßt werden, daß man annehmen sollte, die Methode eigne sich für die Bestimmung dieses Elementes. Die Signale sind gut 20 mal so hoch wie bei der Analyse entsprechender Arsenmengen mit Flammenabsorption. Ähnlich verhält sich Antimon.

Wir haben jedoch feststellen müssen, daß die Signale für diese beiden Elemente nicht auf einer spezifischen Absorption ihrer Resonanzlinien beruhen, sondern zum großen Teil auf einer unspezifischen Lichtschwächung, verursacht durch Absorption eines breiten Spektralbereiches durch die wahrscheinlich vieratomigen Moleküle und/oder auf «Light scattering» durch die bei der Kondensation entstehende Staubwolke. Eine Bestimmung von Arsen und Antimon mit Hilfe unseres dynamischen Vorgehens ist daher wohl möglich, aber unspezifisch. Die Spezifität der Methode müßte durch entsprechende Vortrennungen erst gesichert werden.

Metalle hingegen, die monoatomar verdampfen, lassen sich mit unserer flammenlosen Atomabsorptionsmethode spezifisch und sehr empfindlich erfassen. Wir haben das bisher zeigen können für die Elemente Cadmium, Zink, Blei, Thallium, Kupfer, Silber, Gold und Platin. Reproduzierbare quantitative Resultate liegen allerdings erst für vier dieser acht Metalle vor, was jedoch mehr eine Frage der Zeit und der apparativen Gegebenheiten ist als ein prinzipielles Problem. Eine größere Zahl weiterer Elemente wurde überhaupt noch nicht getestet.

Die elektrolytische Abscheidung kann sowohl kathodisch als auch anodisch erfolgen. Anodische Abscheidung eignet sich besonders für Blei. Da für die Verdampfung durchwegs höhere Temperaturen notwendig sind als beim Quecksilber, muß die Kupferspirale einem Platin- oder Wolframdraht Platz machen. Beim Atomisieren kann diese Spirale nicht mehr außerhalb des Strahlenganges liegen. Sie muß vielmehr direkt in diesen eingeführt werden. Der atomare Dampf bildet sich beim Erhitzen fast augenblicklich und diffundiert auch rasch aus dem Lichtweg heraus oder kondensiert. Die Signale müssen daher mit einem möglichst schnellen Anzeigesystem zeitlich registriert werden. Unser Atomabsorptions-Spektrophotometer, ein Perkin-Elmer-Gerät 303, gestattet, mit einer Zeitkonstante von 0,2 Sekunden zu arbeiten. Die Registrierung erfolgt mit einem Schreiber, der 0,3 Sekunden für den Vollausschlag benötigt. Ein noch schnelleres Anzeigesystem wäre jedoch erwünscht und soll auch noch getestet werden.

Abb. 20 zeigt eine Reihe von Kupferbestimmungen mit dem 0,3-Sekunden-Anzeigesystem. Die Abszisse ist Zeitachse mit Vorschub nach rechts. Die Absorptionssignale sind ohne Ordinatenvergrößerung linear aufgetragen, müssen also noch logarithmiert werden. Die Nachweisempfind-

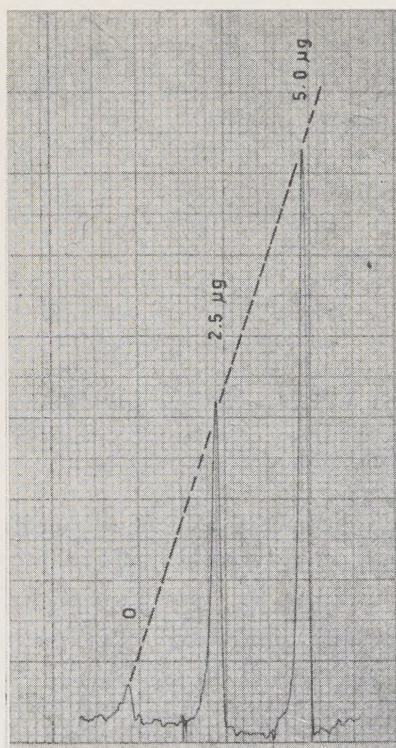


Abb. 19. Versuch zum Nachweis von Arsen durch Abscheidung auf Kupferspirale und Ohmsche Atomisierung. $\lambda = 1937 \text{ Å}$, dynamisches Meßverfahren, Registrierung linear mit dreifacher Ordinatenvergrößerung, Vorschub nach links

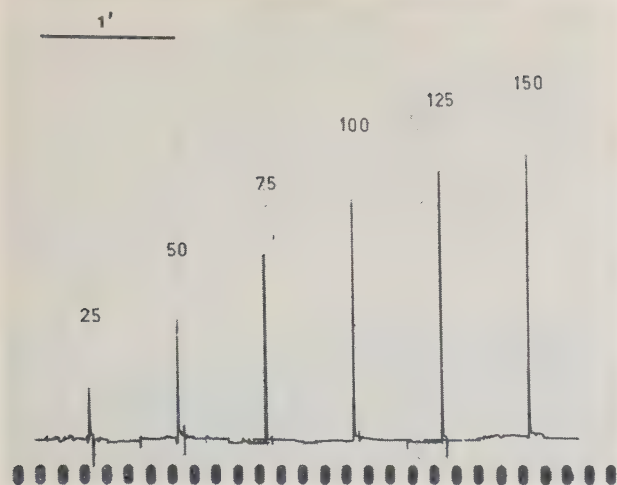


Abb. 20. Kupferbestimmungen aus wässriger Lösung. Zahlen = ng Cu. Wolframprobedraht. Atomisierung in Quarzzelle bei 0,1 mm Hg. Registrierung der Absorption bei 3247 Å mit 0,3 sec. Anzeigesystem linear und ohne Ordinatenvergrößerung, Zeitachse mit Vorschub nach rechts

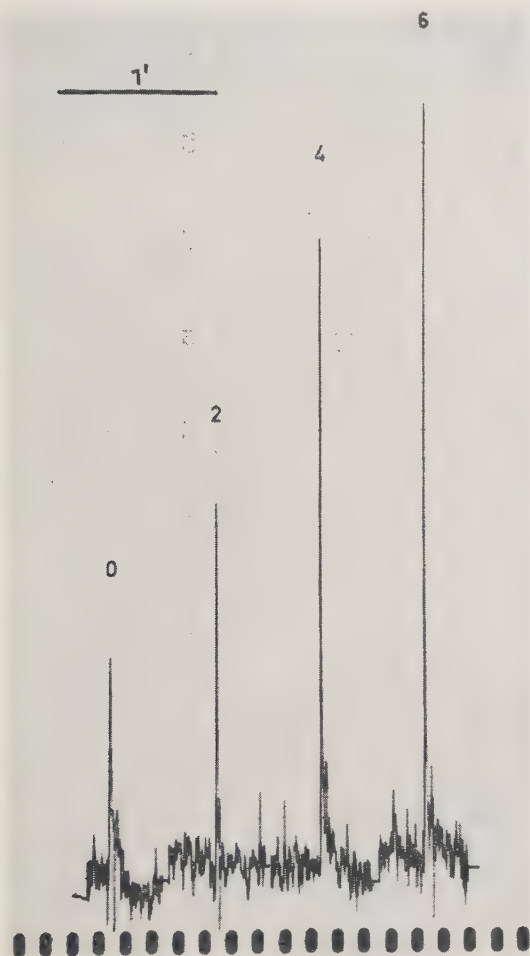


Abb. 21. Kupferbestimmungen aus wässriger Lösung. Zahlen = ng Cu. Wolframprobedraht. Atomisierung in Quarzzelle bei 0,1 mm Hg. Registrierung der Absorption bei 3247 Å mit 0,3 sec. Anzeigesystem linear mit zehnfacher Ordinatenvergrößerung, Vorschub nach rechts. Man beachte den hohen Blindwert und die Tatsache, daß das höchste Signal nicht mehr voll ausgeschrieben werden konnte

lichkeit dieses Systems liegt bei 3 ng. Die Stabilität der Grundlinie erlaubt jedoch eine beträchtliche Dehnung der Absorptionsskala. Abb. 21 zeigt eine Aufnahme mit zehnfacher Ordinatenvergrößerung. Ihr kommt eine Nachweisempfindlichkeit von $5 \cdot 10^{-10}$ g zu. Signalthöhe und Konzentration stehen bei diesen Bedingungen in linearer Beziehung. Bei hohen Signalen ist das allerdings nicht ganz erfüllt, weil unser Anzeigesystem zu langsam arbeitet.

Eine Verzögerung der Kondensation könnte die Forderung nach einem Verstärker- und Anzeigesystem mit kleinerer Zeitkonstante überflüssig machen. Vakuum allein führt nicht zum Ziel. Im Gegenteil, infolge Erhöhung der freien Weglänge wird die Diffusion erleichtert. Neuerdings arbeiten wir in Argonatmosphäre. Dadurch läßt sich die Diffusion der freigesetzten Metallatome von der heißen Drahtspirale weg in den kälteren Teil des Absorptionsrohres verzögern; die Kondensation erfolgt langsamer. Dieser Wechsel von 0,1 mm Restluftdruck zu 760 mm Argon hat gegenüber den gezeigten Kupferbestimmungen eine Empfindlichkeitssteigerung von rund einer Zehnerpotenz mit sich gebracht. Durch Verwendung heißer Absorptionszellen sollte es möglich werden, bedeutend langsamer abklingende oder sogar stehende Signale zu erzeugen. Das ist, neben dem Einsatz schneller registrierender Systeme (Lichtpunktschreiber, integrierende Voltmeter), ein zweiter Entwicklungsweg, den wir gegenwärtig beschreiten.

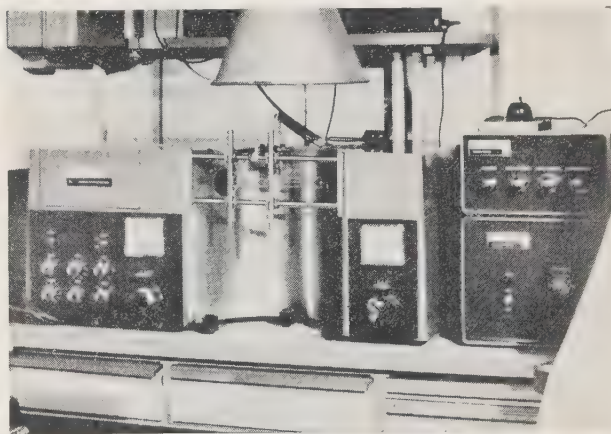


Abb. 22. Atomabsorptions-Spektrophotometer ohne Brenner, mit Absorptionsrohr im Strahlengang. Die Halterung des Rohres erfolgt über die Schienen der herausgenommenen Schutzscheibe des Instrumentes

Abb. 22 zeigt unser Atomabsorptionsgerät mit dem Absorptionsrohr anstelle des Brenners. Es handelt sich hier um das Rohr, welches sich für Quecksilberbestimmungen eignet. Für die übrigen Elemente verwenden wir kleinere Zellen. Abb. 23 zeigt eine Nahaufnahme. Auch diese kürzere Absorptionskammer ist sicherlich noch nicht optimal geformt und wird verbessert werden können. Die Probespirale, der «Sample wire», ist aus Wolfram oder Platin. Ersteres verwenden wir für die

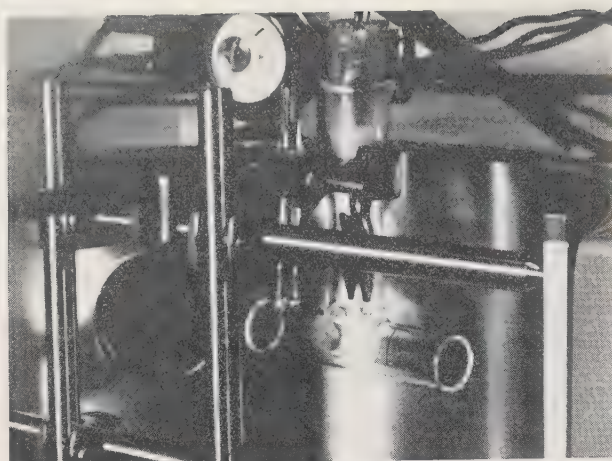


Abb. 23. Nahaufnahme eines Absorptionsrohres mit Probedrahtspirale im Strahlengang des Spektrophotometers

Analyse sehr hoch siedender Metalle, wie Kupfer, Silber, Gold und Platin; letzteres für die Erfassung der etwas leichter verdampfenden Elemente Cadmium, Zink, Blei und Thallium.

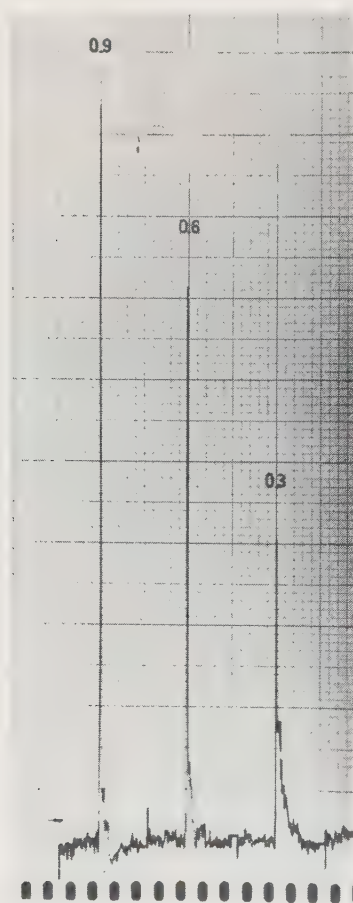


Abb. 24. Cadmiumbestimmungen aus wässriger Lösung mittels der «Free sample wire»-Technik (ohne Absorptionsrohr). Zahlen = ng Cd. Platin-Probedraht-Spirale. Registrierung der Absorption bei 2288 Å mit 0,3 sec. Anzeigesystem linear mit zehnfacher Ordinaten-
dehnung, Vorschub nach rechts

c) «Free sample wire»-Technik

Wir haben nun auch geprüft, ob für die Atomisierung der auf Platin abgeschiedenen Metalle ein Absorptionsrohr, d.h. ein geschlossenes System, überhaupt notwendig sei. Das ist nicht der Fall. Abb. 24 zeigt, daß sich auch ab freier Spirale Cadmium erfassen und bestimmen läßt. Die Registrierungen erfolgten hier linear mit zehnfacher Ordinaten-
dehnung. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei $3 \cdot 10^{-11}$ g.

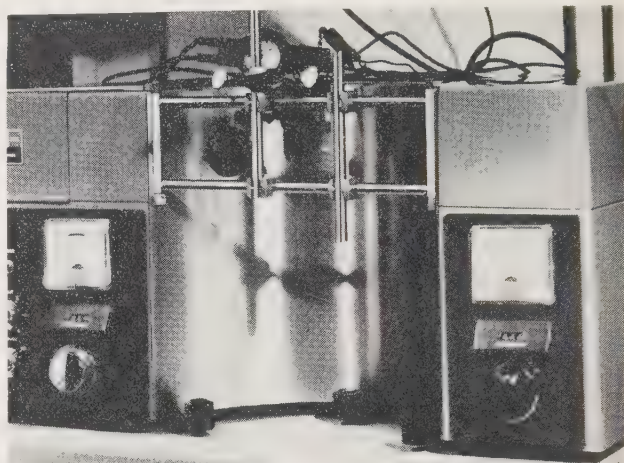


Abb. 25. «Free sample wire»-Technik. Verdampfung ab freier Platindrahtspirale im Strahlengang des Spektrophotometers

Abb. 25 demonstriert die Einfachheit dieses Atomisierungssystems, das wir in Analogie zur «Sample boat»-Technik die «Free sample wire»-Technik nennen wollen.

Die Atomisierung im verschlossenen Absorptionsgefäß, die «Enclosed sample wire»-Technik, hat den Vorteil, daß sie beeinflusst und geleitet werden kann, sei es durch Temperaturerhöhung, Anlegung eines geeigneten Druckes, Verwendung eines geeigneten Füllgases, wie z. B. Argon, Wechsel des Spiralmaterials. Viele Möglichkeiten zur Verbesserung der Methode sind hier noch nicht ausgeschöpft und warten der Bearbeitung.

Die «Free sample wire»-Technik hat demgegenüber den Vorteil der Einfachheit und Billigkeit. Auch sie kann sicher noch perfektioniert werden durch Verwendung schneller anzeigender Systeme oder durch Verbesserung der Spiralgeometrie. Sie wird uns aber nie ein langsamer abklingendes oder sogar stehendes Signal liefern, wie das mit der «Enclosed sample wire»-Technik vielleicht einmal möglich sein wird.

In Abb. 26 sind für vier Elemente die bisher erreichten Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen zusammengestellt. Die Absolutwerte sind eher besser als für die «Sample boat»-Technik, jedoch rund eine Zehnerpotenz schlechter als die Hochtemperaturofen-Resultate von MASSMANN. Wir dürfen jedoch nicht vergessen, daß wir diese Absolutmengen in einem bedeutend größeren Lösungsvolumen erfassen können, so daß die mit unserem Verfahren bestimmbaren Lösungskonzentrationen doch

Element	Cd	Zn	Cu	Ag
Sample wire	Pt	Pt	W	W
Atomisation	free		enclosed argon	
Wavelength in Å	2288	2138	3247	3281
Sensitivity in ng per 1% full scale	0.1	1.0	1.0	0.5
Detection limit with scale exp.				
– absolute in picogram (10 ⁻¹² g)	30	300	200	50
– relative in picogram per ml for a 10 ml sample	3	30	20	5

Abb. 26. Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen bei der analytischen Bestimmung von Cadmium und Zink nach der «Free sample wire»-Technik und von Kupfer und Silber nach der «Enclosed sample wire»-Technik in Argonatmosphäre

wesentlich geringer sein dürften. Sie liegen in der Größenordnung von 10⁻² p.p.b., für Cadmium und Silber sogar 10⁻³ p.p.b. Gegenüber der Flammenabsorptionsanalyse erhalten wir Empfindlichkeitssteigerungen von zwei bis vier Zehnerpotenzen, und das ist doch recht bemerkenswert.

Schlußbemerkungen

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß wir durch Übergang von der Flammenabsorptionsanalyse zur

flammenlosen atomaren Absorption Empfindlichkeitssteigerungen von mehreren Zehnerpotenzen erreichen können. Wir kommen damit in ein Gebiet der Spurenanalytik, in dem nicht mehr die Empfindlichkeit der Methode oder das eingesetzte Instrument begrenzend wirkt, sondern, wie z.B. in der Fluoreszenzanalyse, die Reinheit der verwendeten Chemikalien und Arbeitsgefäße.

Als flammenlose Atomisierungsverfahren erscheinen besonders interessant

- die Hohlkathodentechnik von WALSH für Feststoffe, insbesondere Metalle,
- die Hochtemperaturofen-Verdampfung nach L'vov für sehr kleine Flüssigkeitsvolumen,
- die offene «Sample boat»-Technik von KAHN für Lösungen mit einfacher Matrix, und
- für verdünnte Lösungen oder Lösungen mit komplizierterer Matrix, wie z.B. biologische Flüssigkeiten, unsere «Enclosed sample wire»- oder unsere «Free sample wire»-Atomisierung.

Mit der Einführung flammenloser Atomisierungsverfahren hat sich die noch neue Technik der atomaren Absorptionsanalyse sicherlich in die vorderste Reihe der Spurenmethoden emporgearbeitet.

Gerichtlich-Medizinisches Institut der Universität Zürich
Chemische Abteilung

**Die Gaschromatographie in der toxikologischen Analytik.
Verbesserung von Selektivität und Empfindlichkeit durch
Einsatz multipler Detektoren**

Von *H. Brandenberger*

(Eingang 4. Mai 1970)

Einleitung

Vom Standpunkt des analytischen Praktikers aus gesehen kann man in der bisherigen gaschromatographischen Entwicklung drei verschiedene Phasen erkennen, drei verschiedenartige Tendenzen, die sich allerdings zeitlich etwas überlappen.

Die erste Phase liegt nahezu zehn Jahre zurück. Es handelt sich um die Zeit, in der die ersten kommerziell gebauten Gaschromatographen auf den Markt kamen, meist Instrumente mit Wärmeleitfähigkeits-Detektor. Der Lieferumfang umfaßte damals zwei Metallkolonnen, die eine gefüllt mit apolarer, die andere mit leicht polarer Phase. Diese beiden Kolonnen hat der Praktiker abwechselungsweise eingesetzt; mit ihrer Hilfe hat er Kohlenwasserstoffe getrennt, Carbonyl-Verbindungen nachgewiesen oder gar Fettsäuren in freier oder veresterter Form isoliert und identifiziert.

Bald genügten aber die beiden Trennkolonnen nicht mehr, und damit begann die zweite Phase der Entwicklung. Neue Trennkolonnen wurden gekauft oder selber hergestellt. Neue Adsorbenzien wurden getestet. Das Backsteinmehl als Träger für flüssige Phasen wurde ersetzt durch Celite, Glas, Teflon und anderes mehr, sogar durch Waschmittelpulver. Insbesondere wurden aber die flüssigen Phasen variiert. Für jedes Trennproblem hat man nach der idealen Trennphase gesucht, und ganz Begeisterte gingen sogar dazu über, eigene Kolonnenfüllungen zu synthetisieren, zugeschnitten auf einen ganz spezifischen Bedarf. So häufte sich die Zahl der Kolonnen ständig, und das gaschromatographische Laboratorium wurde bald zum Kolonnenarsenal, in dem nur noch der Eingeweihte die richtige Wahl treffen konnte.

Heute haben viele Analytiker die Anzahl der verwendeten Kolonnen-Füllungen wieder reduziert. Einige Trennphasen haben sich herausgeschält aus der großen Zahl, sei es dank ihrem geringen «bleed», sei es dank relativ weitgespannter Einsatzfähigkeit. So lassen sich über 90 % der gaschromatographischen Aufgaben, mit denen man sich im weiten Feld der toxikologischen Analytik konfrontiert sieht, mit etwa 10 verschiedenen Trennkolonnen gut bewältigen.

Wir selber arbeiten

- für die Auftrennung von Lösungsmittelgemischen und die Erkennung einzelner Lösungsmittel-Komponenten mit dem synthetischen Adsorbens Poropak Q (oder einem gleichwertigen Produkt wie Chromosorb 102) und für die Gas-Flüssig-Chromatographie mit einem Polyglykol, z.B. Carbowax 20 M;
- für die Isolierung und den Nachweis von Pestiziden mit den flüssigen Phasen Dow-11 (oder einem entsprechenden methylierten Silicon), OV-17 (einem halb phenylierten, halb methylierten Silicon) und dem Trifluoropropyl-methyl-silicon QF-1;
- für die sehr weitgespannten Bedürfnisse der Pharmaka-Analyse, je nach Acidität und Polarität der zu erfassenden Komponenten, mit einem Cyano-äthyl-silicon (XF-1150), einem Methyl-silicon (SE-30, OV-1, Dow-11) sowie für basische Komponenten mit Polyäthylenimin (für leicht flüchtige Komponenten wie Amphetamine) oder dem Polyamid-Harz Versamid-900;
- für den Nachweis von Gaskomponenten mit den Adsorbentien Silicagel, Molekularsieb und mit Poropak Q.

Die flüssigen Phasen werden auf möglichst inaktives Trägermaterial (silanisiertes Chromosorb oder entsprechende Produkte; für schwache Belegungen Glaspulver) aufgetragen. Meist verwenden wir Kolonnen aus Glas.

Mit dieser Beschränkung auf eine kleine Anzahl Trennmedien ist die zweite Phase der gaschromatographischen Entwicklung abgeflaut und hat einer dritten Entwicklungstendenz Platz gemacht, nämlich der Variation der Detektoren und dem parallelen Einsatz multipler Detektoren. Diese Entwicklung, nicht über vier Jahre alt, hat der toxikologischen Analyse sehr viele neue Möglichkeiten geliefert, nicht nur, wie oft fälschlicherweise angenommen, auf dem Gebiete des Pestizid-Nachweises, sondern über den gesamten Bereich der Suche nach organischen Giftstoffen in biologischem Material.

Spuren-Detektoren

Toxikologie ist meist Spurenanalytik. Es sind deshalb nur die empfindlicheren unserer Detektor-Systeme, die mit Erfolg eingesetzt werden können. Wir selber benutzen, einzeln und in Kombination:

- den Flammenionisations-Detektor als Massenmonitor für organische Verbindungen,
- den Elektroneneinfang-Detektor als spezifischen Detektor für stark elektronen-affine Substanzen, insbesondere für Halogen-, Phosphor- und Schwefel-Verbindungen sowie konjugierte Systeme,
- den Phosphor-Detektor als element-spezifisches Nachweismittel,
- massenspezifische Detektorsysteme.

Den kombinierten Einsatz dieser Detektoren sollen einige Beispiele illustrieren. Vorher sei jedoch erwähnt, daß diese Liste nicht etwa vollständig ist. Auch andere Detektoren, wie zum Beispiel das empfindliche coulometrische Anzeigesystem von *Coulson*, würden sich für die toxikologische Analyse eignen; wir kennen sie jedoch nicht aus eigener Praxis. Dann sind heute interessante neue Detektoren in Entwicklung, wie der Photoionisations-Detektor, und schließlich ist mit der Erwähnung der massenspezifischen Detektions-Systeme bereits der erste Schritt getan zur Kombination des gaschromatographischen Trenngerätes mit der spektrometrischen Identifikation, auf deren Bedeutung für die Toxikologie wir abschließend ebenfalls kurz eingehen werden.

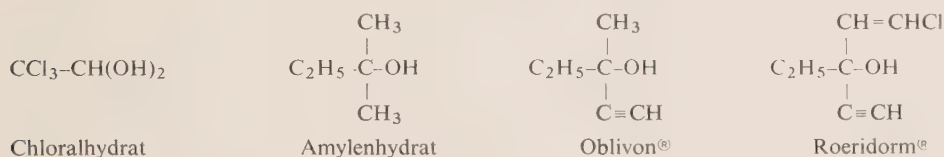
Zweikanal-Gaschromatographie in der Schlafmittel-Analyse

Als Beispiel für den kombinierten Einsatz von Flammenionisations-Detektor (FID) und Elektroneneinfang-Detektor (EED) soll die toxikologische Schlafmittelanalyse dienen.

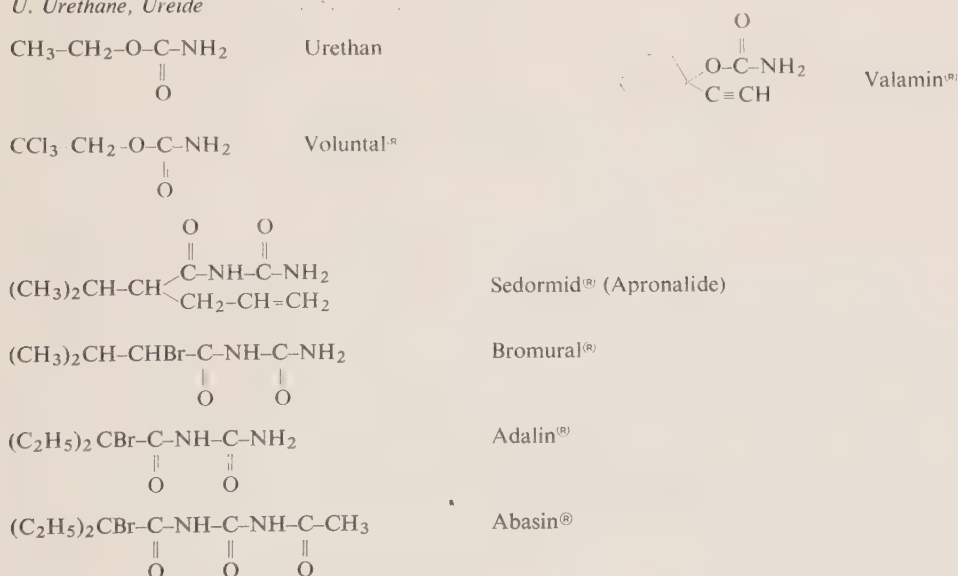
Abbildung 1

Die vier wichtigsten Schlafmittel-Gruppen

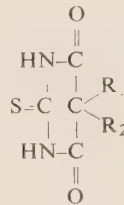
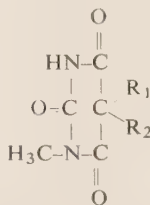
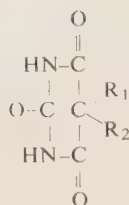
A. Alkohole



U. Urethane, Ureide

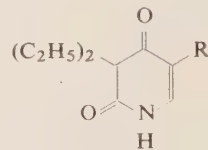
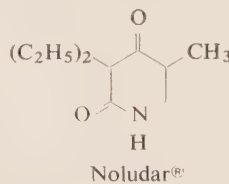
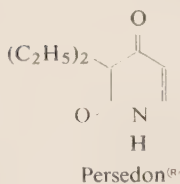
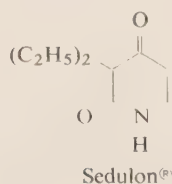


B. Barbiturate



P. Piperidin-dione

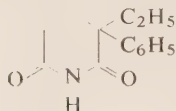
2,4-Dioxo-Verbindungen



Noludar[®]-
Metaboliten

R = CH₃
= CH₂OH
= COOH

2,6-Dioxo-Verbindungen



Doriden[®]

Für unsere analytischen Bedürfnisse gliedern wir die Schlafmittel in sechs Gruppen, von denen vier in Abb. 1 angeführt sind, nämlich:

- Die Gruppe der Alkohole und Aldehyde (A), oft mit Acetylen-Gruppierung, neutral und wasserdampflich.
- Typische Vertreter: Amylenhydrat, Oblivon[®], Roeridorm[®]; Chloralhydrat.
- Die Gruppe der Urethane und Ureide (U), neutral und nicht wasserdampflich; Ureide zum Teil bromhaltig.
- Typische Vertreter: Urethan, Voluntal[®], Valamin[®]; Sedormid[®] (Apronalide); Bromural[®], Adalin[®], Abasin[®].
- Die Gruppe der Barbiturate (B), inklusive N-Methyl-barbiturate und Thio-barbiturate, schwach sauer (phenolisch), nicht dampfflüchtig.
- Die Gruppe der Piperidin-dione-2,4 und -2,6 (P), neutral oder schwach sauer, nicht dampfflüchtig.
- Typische Vertreter: Sedulon[®], Persedon[®], Noludar[®] und Metaboliten; Doriden[®].

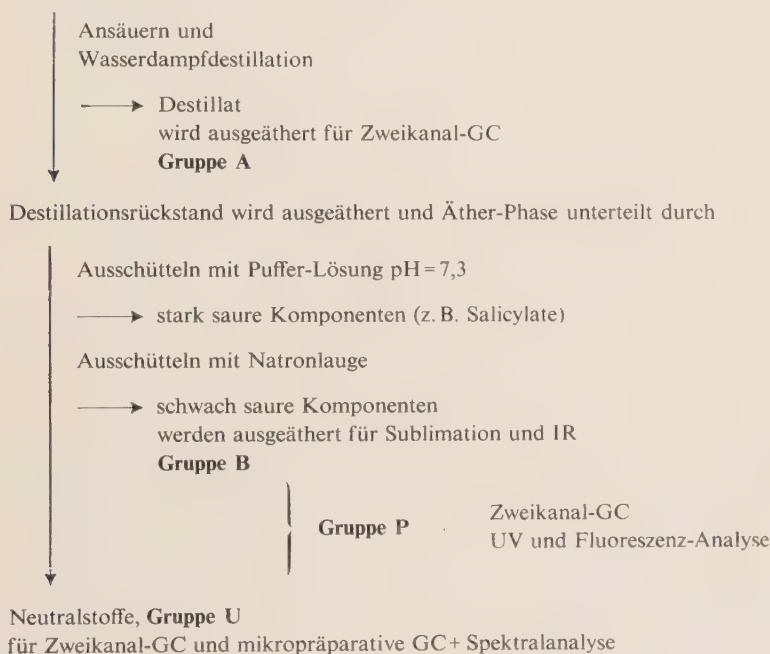
Die zwei hier nicht berücksichtigten Gruppen sind Schlafmittel mit alkalischem Charakter (Diazepin-Derivate wie Mogadon[®] und die Quinazolinone wie Methaqualon).

Auch bei der Verwendung instrumenteller Analysenmethoden sind Vortrennungen notwendig. Abb. 2 zeigt, wie wir vorgehen:

Die Klasse A wird durch Wasserdampfdestillation und Extraktion des Destillates mit Äther abgetrennt. Der Destillationsrückstand wird angesäuert und die nicht dampfflüchtigen neutralen und sauren Pharmaka mit Äther extrahiert. Die Unterteilung nach Acidität erfolgt durch flüssig-flüssig Extraktionen. Der stark saure Auszug enthält neben Salicylaten und Butazolidin® auch Fettsäuren und Farbstoffe. Die Barbiturate finden wir im schwach sauren Extrakt, oft in erstaunlicher Reinheit, während der Neutralextrakt mit der Klasse U vielfach noch Fett enthält, das abgetrennt werden muß. Die Vertreter der Klasse P verteilen sich auf den schwach sauren und den neutralen Extrakt.

Abbildung 2
Trennschema der Schlafmittel-Analyse

Körperflüssigkeit oder homogenisiertes Organ



Für den Nachweis der Vertreter der Klassen A, U und P eignet sich die Zweikanal-Gaschromatographie mit parallel geschaltetem FID und EED besonders gut¹. Nur bei der Schlafmittel-Gruppe B, den Barbituraten, setzen wir die gaschromatographische Analyse nicht ein. Barbiturate lassen sich durch UV-Spektrophotometrie des schwach sauren Extraktes in wäßrigen Lösungen verschiedener Acidität mit Sicherheit erkennen. Durch Mikro-Vakuumsublimation des Extraktes fallen sie meist

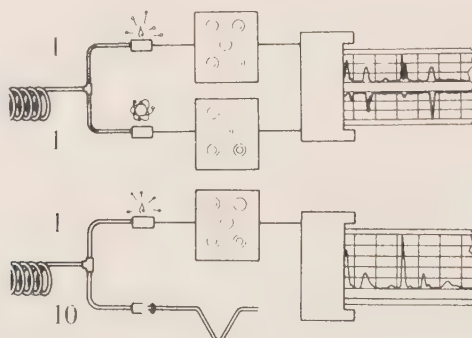
¹ Brandenberger H., *Chimia* 19, 597 (1965).

so rein an, daß wir sie infrarot-spektrophotometrisch mit Sicherheit identifizieren können².

Abb. 3 zeigt unsere gaschromatographische Anordnung im Schema³. Ein 1:1 Stromteiler führt das aus der Kolonne austretende Gas auf die beiden ungleichartigen Detektoren. Der FID figuriert als Massenmonitor, während der EED nur die stark elektronenaffinen Verbindungen anzeigt, in Abhängigkeit von ihrer Elektroneneinfangsausbeute. Die zweite Kolonne bildet ein unabhängiges System. Ein 1:10 Splitter mündet sowohl in einen Detektor als auch in eine Auffangfalle. Wir bedienen uns ihrer, wenn wir Komponenten für spektrometrische Identifikationen auffangen wollen. Eine solche Anordnung läßt sich in den meisten Gaschromatographen leicht einbauen. In den neuen Instrumenten ist sie vielfach schon vorhanden.

Abbildung 3

Schema des Zweikolonnengerätes mit 1:1 Splitter (oben), führend auf FID und EED, sowie 1:10 Splitter (unten) führend auf FID und Kondensationsrohr



Für die Identifikation ziehen wir neben den relativen Retentionszeiten (RRT) stets auch das Verhältnis der beiden Detektorausschläge heran. Beide sind konzentrationsabhängig. Der EED-Ausschlag ist zudem abhängig von der Elektronenaffinität der erfaßten Substanz. Der Quotient der beiden Ausschläge, den wir relative Elektroneneinfangsausbeute (REA) nennen, ist daher konzentrationsunabhängig und substanzspezifisch.

In Tab. 1, 2 und 3 sind die RRT und die REA für verschiedene typische Vertreter dreier Schlafmittel-Gruppen festgehalten⁴. In Tab. 1 finden wir die Zahlen für die Schlafmittelgruppe A. Roeridorm® mit seinem einzelnen Chlor-Atom ergibt mit beiden Detektoren gleich große Ausschläge; die REA liegt um 1. Das sehr elektronenaffine Chloralhydrat mit seinen 3 Chlor-Atomen besitzt eine

² Brandenberger H., Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 306 (1966); Praxis 56, 1305 (1967).

³ Lovelock J. F., Anal. Chem. 35, 474 (1963);

Oaks D. M., Hartmann H. und Dimick K. P., Anal. Chem. 36, 1560 (1964).

⁴ Brandenberger H., IV. Internationaler Kongreß der forensischen Wissenschaften, Kopenhagen, 1966, Abstrakt-Band, S. 124.

Tabelle 1
Gaschromatographische Trennung der Gruppe A
 (30 % XF-1150 auf Chromosorb W-AW)

Verbindung	RRT	REA	Erfaßbare Menge [ng]
Amylenhydrat	1,0	10^{-2}	20 (FID)
Chloralhydrat	1,4	10^4	0,02 (EED)
Oblivon®	2,2	10^{-2}	20 (FID)
Roeridorm®	11	10^0	10 (FID, EED)

Tabelle 2
Gaschromatographische Trennung der Gruppe U
 (3 % XF-1150 auf Chromosorb G-AW-DMCS)

Verbindung	RRT*	REA	Erfaßbare Menge [ng]
Voluntal®	1,0	10^3	0,05 (EED)
Valamin®	1,4	$< 10^{-1}$	50 (FID)
Adalin®	2,9	10^2	0,5 (EED)
Sedormid®	6,8	$< 10^{-1}$	50 (FID)
Bromural®	7,6	10^2	0,5 (EED)
Abasin®	12,0	10^2	0,5 (EED)

* Identisch RT auf 1-m-Kolonne bei 150°, in min.

Tabelle 3
Gaschromatographische Trennung von Piperidin-dionen
 (3 % XF-1150 auf Chromosorb G-DMCS)

Verbindung	RRT	REA
Noludar®	1,00	$< 0,1$
Sedulon®	1,15	$< 0,1$
Methylpersedon® ^(a)	1,25	~ 30
Persedon®	1,65	~ 30
Doriden®	3,25	$< 0,1$

REA von etwa 1000. Wir haben es hier, wie man sieht, nicht mit genauen Zahlen, sondern mit Größenordnungen zu tun. Die REA-Werte der beiden nicht halogenierten Verbindungen liegen nahe bei 0, denn der EED wird sie normalerweise nicht erfassen.

Tab. 2 enthält die entsprechenden Werte für die Schlafmittelgruppe U. Unsere Analysenanordnung ist wiederum am empfindlichsten für den Vertreter mit den 3 Chlor-Atomen, das Voluntal®. Die REA liegt hier um 1000. Valamin® und Sedormid®, beide ohne Halogen-Atome, besitzen eine REA von gegen 0. Hier kommt unserem Analysensystem nur noch die normale Empfindlichkeit des FID zu. Für die Schlafmittel-Wirkstoffe, die 1 Brom-Atom im Molekül besitzen wie Adalin®, Bromural® und Abasin®, liegt die REA um 100. Diese Substanzen werden demnach hundertmal empfindlicher angezeigt als Valamin® und Sedormid®.

Tab. 3 enthält die RRT und die REA für die Schlafmittel-Gruppe P. Der EED spricht auf die total kernhydrierten Piperidin-Derivate nicht an, wohl aber auf die Tetrahydropyridine, also auch auf Persedon® und die Oxydationsprodukte des Noludar®^{1, 4}. Bei diesen Verbindungen liegt der REA-Wert um 30, so daß z.B. eine Unterscheidung von Sedulon® (2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-piperidin) und Methylpersedon® (2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin) ohne weiteres möglich ist.

Abbildung 4
Noludar®-Metabolite

Diese konnten wir mittels Kombination von Gaschromatographie mit spektrophotometrischen Analysen in einem durch Alkohol potenzierten tödlichen Vergiftungsfall in verschiedenen Körperteilen nachweisen.

Mageninhalt			
	GC, IR	GC, SF	
Blut			
Leber	GC	UV, SF	
Gehirn		(Persedon [®] !)	
	UV, SF		
Niere			
Urin	GC	UV	
	evtl.		

GC = Gaschromatographie

UV = Ultraviolett

SF = Spektralfluorimetrie

Die Zweikanal-Gaschromatographie ist auch wertvoll zur Erfassung von Schlafmittel-Metaboliten. Als Beispiel sei eine tödliche Vergiftung durch Noludar® angeführt. Die Wirkung des Noludar® war potenziert durch eine beträchtliche Einnahme von Alkohol. Die Alkohol-Konzentration im Gehirn betrug beim Todeseintritt 1,5‰. Die qualitative Seite unserer analytischen Untersuchung ist in Abb. 4 zusammengefaßt:

- Der Mageninhalt enthält neben dem eingenommenen Noludar® noch etwas kern-

hydrierte Verbindung (5-Methyl-persedon®), die ja bereits im Handelsprodukt in Spuren vorkommt.

- In Blut und Leber tritt dieses Tetrahydro-pyridin in den Vordergrund, wird aber zum Teil durch Oxydation der Seitenkette zum 5-Hydroxymethyl-Derivat abgebaut.
- In Niere und Urin ist die Oxydation der Seitenkette weiter fortgeschritten. Wir finden neben den vorerwähnten Verbindungen auch die Carbonsäure (2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydropyridin-5-carbonsäure) und deren Decarboxylierungsprodukt, das Persedon®.

Im Gehirn ließ sich erstaunlicherweise nur Persedon® nachweisen.

Zweikanal-System in der Pestizid-Analyse

Der parallele Einsatz von FID und EED ist auch in der Pestizid-Analyse wertvoll⁵. Handelt es sich um den Nachweis von Phosphor- oder Thiophosphorsäureester, so sollte unbedingt auch der Thermionic-Detektor (TID) oder Phosphor-Detektor eingesetzt werden. Da sich dieser leicht gegen den FID austauschen läßt, kann eine analoge Versuchsanordnung verwendet werden. Man fährt ein erstes Chromatogramm mit der ersterwähnten Zweikanal-Anordnung. Finden sich dabei Komponenten mit REA-Werten zwischen 100 und 500, wie sie Phosphorsäureester besitzen, so ersetzt man den FID durch den TID. In einem zweiten Gaschromatogramm wird auf Vorliegen von phosphor-organischen Verbindungen geprüft. Ein Dreiweg-Splitter wäre natürlich wertvoll, sowohl zeit- wie auch substanzsparend, ließ sich aber leider noch nicht praktisch verwirklichen.

Mit drei Detektor-Systemen erhalten wir drei substanz-spezifische Größen, nämlich:

1. relative Retentionszeiten (RRT),
2. relative Elektroneneinfangausbeuten (REA) als Quotienten der EED- durch FID-Ausschläge,
3. die Quotienten der TID- durch EED-Ausschläge.

Mit diesen analytischen Daten konnten wir kürzlich nach längerem Suchen eine tödliche Pestizid-Vergiftung klären. Sie ging uns als Parathion-Intoxikation zu, erwies sich aber als Mevinphos-(Phosdrin-)Vergiftung. Das ergab sich nicht nur aus den bedeutend kürzeren Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Untersuchung, sondern auch aus den Quotienten der Detektorausschläge, die in Tab. 4 festgehalten sind. Die REA betrug 100 und nicht 400 wie für Parathion. Der Quotient TID/EED betrug 20 und nicht 1 wie für Parathion. Beide Größen stimmen für Mevinphos.

⁵ Brandenberger H. und Müller S., Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. 56, 281 (1965); *Chimia* 19, 546 (1965).

Tabelle 4

REA-Werte und Quotienten von TID- durch EED-Signale für einige Pestizide

	REA	$\frac{TID}{EED}$
$ \begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{O}-\text{C}=\text{CH}-\text{C}-\text{OCH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{OCH}_3 \text{ CH}_3 \text{ O} \end{array} $ Mevinphos	100	20
$ \begin{array}{c} \text{OCH}_3 \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{S}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}-\text{C}-\text{OC}_2\text{H}_5 \\ \quad \quad \\ \text{OCH}_3 \text{ CH}_2-\text{C}-\text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{O} \end{array} $ Malathion	200	1
$ \begin{array}{c} \text{OC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{S}=\text{P}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array} $ Parathion	400	1
$ \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{Cl} \text{ Cl} \text{ Cl} \text{ Cl} \text{ Cl} \end{array} $ Aldrin	1000	0

Die Substanz war uns lange entgangen. Das lag an ihrer schlechten Wasserdampflichkeit und an der geringen Löslichkeit in Hexan sowie an den gegenüber den anderen Pestiziden bedeutend niedrigeren gaschromatographischen Retentionszeiten. Es handelte sich um den ersten Vergiftungsfall, in dem wir Mevinphos nachweisen konnten. Unseres Wissens ist es erst die zweite in der Schweiz bekanntgewordene tödliche Mevinphos-Vergiftung. Demgegenüber sind Parathion-Vergiftungen recht häufig. Selbstverständlich haben wir die Substanz auch gaschromatographisch mikropräparativ isoliert und spektrometrisch identifiziert (IR, MS). Bei forensischen Untersuchungen kann man ja nie genügend vorsichtig sein, insbesondere wenn man ein Gift zum erstenmal nachweist.

Wie aus den Zahlenwerten für die Verhältnisse der Detektor-Ausschläge (Tab. 1–4) hervorgeht, erhöht sich durch den Miteinbezug eines EED und eines TID in das gaschromatographische Analysensystem nicht nur die Spezifität, sondern in vielen Fällen auch die Empfindlichkeit des Nachweises. Man darf aber nicht vergessen, daß sich die Empfindlichkeit eines EED oder eines TID von Substanz zu Substanz ganz drastisch ändern kann.

Ein EED reagiert am empfindlichsten auf Halogen-Verbindungen. Je mehr Halogen-Atome vorhanden sind, um so stärker spricht er an. So sind wir in der Lage, bei gleichbleibenden äußeren Bedingungen die folgenden Methan-Chlorkohlenwasserstoff-Mengen noch nachzuweisen⁶:

Tetrachlorkohlenstoff, CCl_4	ca. 3 pg
Chloroform, CHCl_3	ca. 70 pg
Methylenchlorid, CH_2Cl_2	ca. 1300 pg

Die Nachweisempfindlichkeit erhöht sich demnach pro zusätzliches Chlor-Atom im Molekül um rund das Zwanzigfache. Eine solche Faustregel überall zu suchen oder gar anzuwenden wäre aber verfehlt, wie wir an den Äthan-Kohlenwasserstoffen erkennen können. Hier haben wir mit unserem Elektroneneinfang-Detektor folgende Nachweisgrenzen festhalten können⁶:

Tetrachloräthylen, $\text{CCl}_2=\text{CCl}_2$	ca. 12 pg
Tetrachloräthan, $\text{CHCl}_2-\text{CHCl}_2$	ca. 40 pg
Trichloräthylen, $\text{CCl}_2=\text{CHCl}$	ca. 90 pg
1,1,1-Trichloräthan, CCl_3-CH_3	ca. 30 pg
1,1,2-Trichloräthan, $\text{CHCl}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$	ca. 750 pg

Wie bereits erwähnt, zeigt der EED auch Phosphor- und Schwefel-Verbindungen an, ferner erfaßt er Moleküle mit Nitro-Gruppen, Diketo-Gruppierungen, gewisse Ringsysteme, wie die von uns bearbeiteten Tetrahydropyridine, dann auch hochkondensierte Aromaten wie z. B. Benzpyren. Die Empfindlichkeit ist aber für diese Verbindungstypen höchstens eine bis zwei Zehnerpotenzen höher als diejenige eines FID.

Die Empfindlichkeit des TID hängt stark davon ab, wie er ausgelegt ist (Fabrikat) und betrieben wird (Verhältnis von Wasserstoff- und Luftstrom). Für die Pestizid-Analyse arbeiten wir mit einer Anordnung, die möglichst nur die phosphorhaltigen Moleküle anzeigt und nicht die Halogen-Verbindungen. Ein solcher Detektor ist in der Lage, noch 25 pg Mevinphos zu erfassen, während der EED erst 500 pg oder mehr registriert.

Massenspezifische Detektion

Der FID ist unser unspezifisches Detektorsystem, der Massenmonitor für organische Substanzen. Der EED ist bereits ein spezifisches System, das nur die elektronen-

⁶ Brandenberger H. und Borer S., in Vorbereitung.

affinen Komponenten aus dem Chromatogramm herausliest. Noch spezifischer wirkt der TID, kann er doch so ausgelegt werden, daß er praktisch nur die phosphorhaltigen Moleküle exponiert. Sucht man nach einem noch spezifischeren Nachweis, so muß man zur massenspezifischen Detektion greifen. Darunter verstehen wir die kontinuierliche Registrierung einer Masse oder mehrerer Massen in einem gaschromatographischen Eluat. Diese Aufgabe kann von einem Massenspektrometer übernommen werden, wobei in den meisten Fällen ein Kleinmassenspektrometer (Kostenpunkt um Fr. 100000.–) genügen dürfte. Die Spezifität eines Detektors muß demnach erkaufte werden; doch liefert ein solches System auch sehr wertvolle Informationen. Identifikationen lassen sich durchführen:

1. mit Hilfe der RRT-Werte;
2. durch den Nachweis einer oder mehrerer typischer Massen in der betreffenden Fraktion, wobei es sich bei diesen Massen um Molekül-Peaks und/oder um Fragmente der betreffenden Verbindung handeln kann sowie auch um deren Isotopen-Peaks;
3. durch Etablierung der charakteristischen Intensitäts-Verhältnisse zwischen den Massen im Fokus.

Die Nachweisempfindlichkeit eines solchen Systems ist abhängig vom verwendeten Massenspektrometer und von der Intensität des oder der erfaßten Ionen. Sie ist auf alle Fälle besser als bei einem wiederholten massenspektrometrischen «scan» des Kolonneneluates. In günstigen Fällen können Picogramme noch erfaßt werden.

Man hat dieser Art Gaschromatographie «Massenfragmentographie»⁷ getauft. Wir glauben nicht, daß ein solcher Name gerechtfertigt ist. Wir haben ja auch keine neue Namensgebung eingeführt beim Übergang zu anderen gaschromatographischen Detektoren wie dem EED oder dem TID. Beschreibende Ausdrücke wie «Gaschromatographie mit spezifischer Massenfokussierung» oder «Gaschromatographie mit massenspezifischer Detektion» erscheinen uns treffender.

Auch bei dieser Art Gaschromatographie wird man vorteilhaft ein Gesamtchromatogramm fahren, sei es durch Einsatz eines FID oder durch Aufzeichnung des Gesamtionenstromes nach massenspektrometrischer Fragmentation. Da die massenspezifische Detektion aber ganz bedeutend empfindlicher sein kann als diese beiden als Massenmonitoren verwendeten Nachweismittel, kann es leicht vorkommen, daß wir ein schönes massenspezifisches Chromatogramm erhalten, während mit dem FID oder der Gesamtionenstrom-Anzeige überhaupt keine Ausschläge erzielt werden.

Einige Beispiele sollen das experimentelle Vorgehen beleuchten. Außer der ersten Anwendung (A), die wir aus didaktischen Gründen hier einfügen, sind alles Beispiele aus unserer analytischen Praxis.

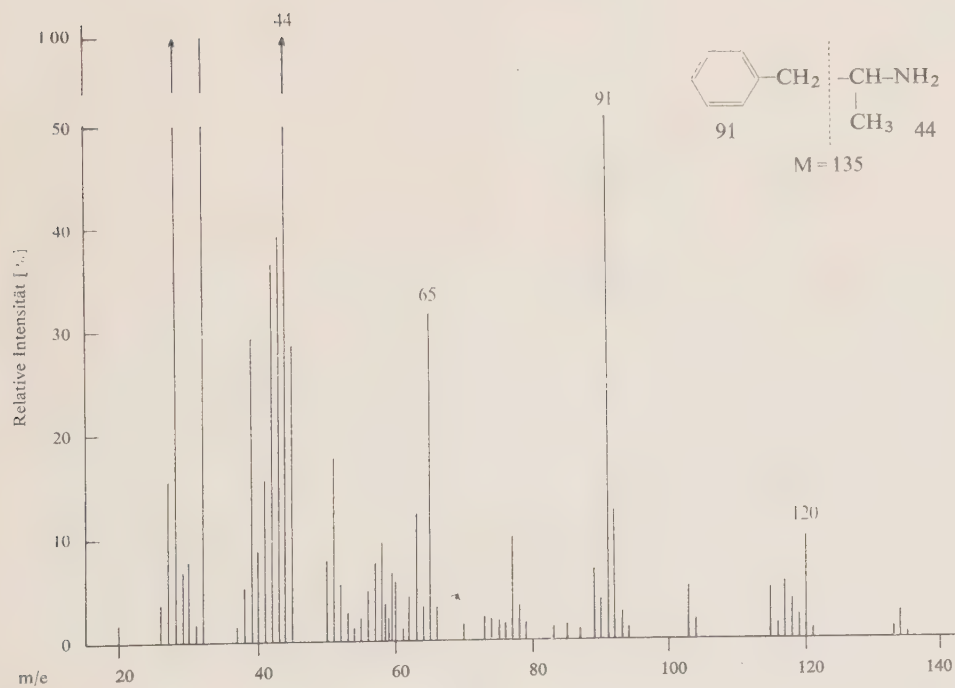
A. Zur Erfassung von Naphthalin fokussiert man am besten auf das Molekül-Ion 128. Wie aus Tab. 5 ersichtlich, ist dieses das intensivste Ion im Massenspektrum; die Fokussierung auf das Mole-

⁷ Hammar C.G., Holmstedt B. und Ryhage R., *Anal. Biochem.* 25, 532 (1968).

Tabelle 5
Massenspektrum von Naphthalin

m/e	Intensität [%]
50	2,2
51	6,7
62	1,0
63	4,5
74	2,3
75	2,7
76	2,0
77	3,0
78	1,9
101	2,2
102	5,5
126	5,9
127	11,8
128	100,0 * MG
129	10,9

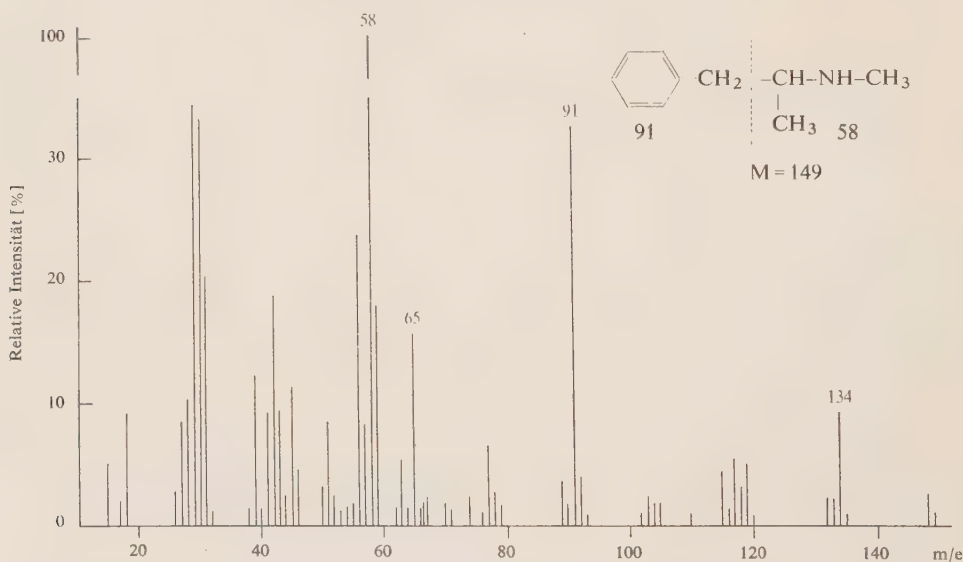
Abbildung 5
Massenspektrum von Amphetamin



kül-Ion liefert die beste Empfindlichkeit. Wir erhalten ein Chromatogramm, welches nur die Elution von Verbindungen anzeigt, die bei der massenspektrometrischen Fragmentierung ein intensives Ion mit Masse 128 liefern und alle andern Moleküle übersieht. Das Gesamtmassenchromatogramm, das gleichzeitig durch Registrierung des Totalionenstromes aufgenommen werden kann, zeigt indessen alle eluierten ionisierbaren Komponenten an. Liegt das Naphthalin in sehr geringer Konzentration vor, unter 10 ng, so kann es nur durch die spezifische Massenfokussierung gesichtet werden, die bedeutend empfindlicher ist als die Totalionenstrom-Anzeige.

B. Zur Identifikation von Amphetamin wäre es ungünstig, auf das Molekül-Ion 135 zu fokussieren. Wie das Massenspektrum in Abb. 5 zeigt, ist dieses Ion wenig intensiv. Die Verbindung wird stark abgebaut, wobei das Fragment 91 als Haupt-Ion auftritt, das Benzyl- oder Tropylium-Kation. Eine Fokussierung auf Ion 91 ist zwar sehr empfindlich, doch bedeutend weniger spezifisch, da alle Verbindungen mit Benzyl-Rest dieses Ion ergeben. Sie kann jedoch von großem Nutzen sein, wenn man z.B. aus einem komplexen Chromatogramm ganz allgemein die Peaks herauslesen will, die von gewissen Dopingmitteln herrühren. Sowohl Amphetamin wie auch Methyldamphetamin, dessen Massenspektrum wir in Abb. 6 sehen, werden dann erfaßt.

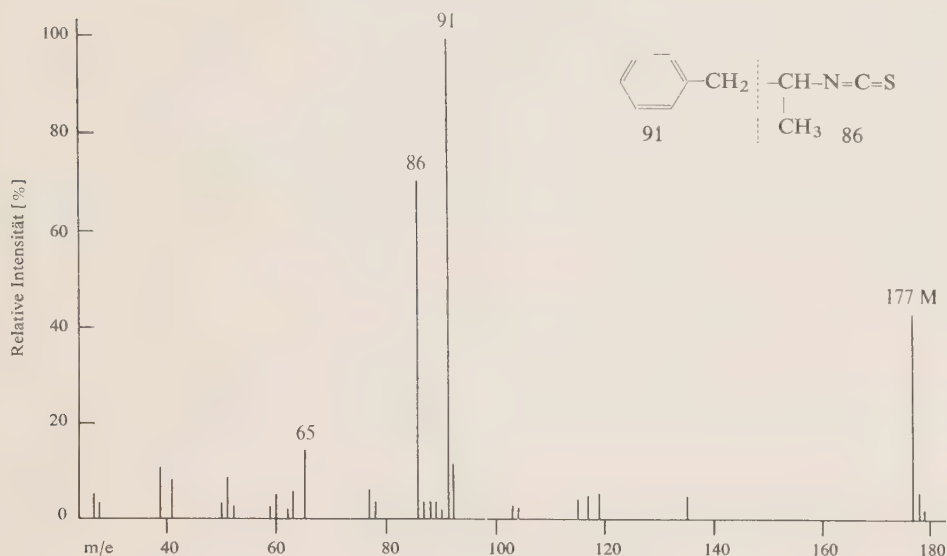
Abbildung 6
Massenspektrum von Methyldamphetamin



Wir haben kürzlich auf dieser Basis einen einfachen Schnelltest zur Erfassung der Amphetamine ausgearbeitet⁸. Das biologische Untersuchungsmaterial, z.B. eine Urinprobe, wird in ein Fläschchen mit Membranverschluß, welches Natriumcarbonat enthält, eingebracht. Die organischen Basen werden durch das Carbonat freigesetzt und im Dampfraum des Fläschchens angereichert. Dann wird durch die Membran mit einer gasdichten Injektionsnadel 1 oder 2 ml Gas entnommen und direkt in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Fraktionierung erfolgt an einer Kolonne mit Polyäthylenimin auf silanisiertem Chromosorb. Der Kolonnenausgang ist mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Tritt ein Phenyläthylamin in dieses ein, so entsteht als Hauptfragment das Ion m/e 91. Da wir während der Chromatographie diese Ionen-Konzentration im Eluat ständig registrieren, lassen sich die austretenden Amphetamine als Peaks erfassen.

⁸ Brandenberger H. und Schnyder D., in Vorbereitung.

Abbildung 7
Massenspektrum von (1-Phenyl-isopropyl)-isothiocyanat
(dem Senföl aus Amphetamin)



C. Wir haben früher gezeigt⁹, daß sich Amphetamin beim Zusatz von Schwefelkohlenstoff zum ätherischen Extrakt schon in der Kälte quantitativ zum Senföl umsetzt. Abb. 7 zeigt dessen Formel und Massenspektrum. Das Senföl läßt sich gaschromatographisch besser erfassen als die Base. Da der Einbau von Schwefel das Molekül stark elektronenaffin gemacht hat, kann auch ein EED eingesetzt werden, was sowohl Spezifität als auch Empfindlichkeit der Bestimmung erhöht. Zusammen mit *Ryhage* haben wir nun zeigen können, daß Empfindlichkeit und Spezifität der Bestimmung noch weiter gesteigert werden können durch Erfassung der Massen 177 und 179 im Kolonnen-Eluat¹⁰. Das Molekül ist durch den Umbau stabilisiert, der Molekül-Peak 177 relativ hoch. Durch die Einführung eines Schwefel-Atoms muß die Verbindung auch in isotoper Form mit S-34 auftreten, also mit Masse 179. Bei gleichzeitiger Erfassung beider Massen läßt sich als substanz-charakteristische Größe auch das Isotopenverhältnis festhalten.

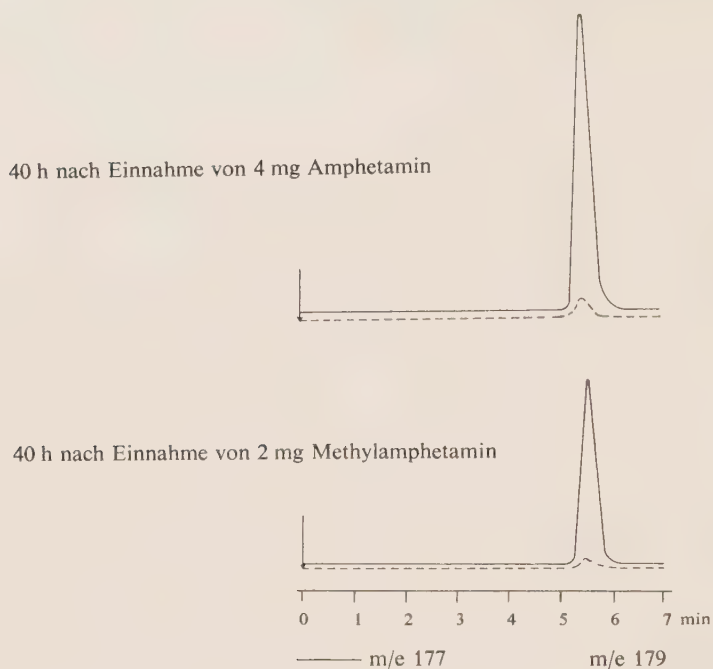
Abb. 8 zeigt 2 solche massenspezifische Chromatogramme. Die Fokussierung erfolgt auf die m/e-Werte 177 (Molekül-Ion mit S-32) und 179 (isotopes Molekül-Ion mit S-34). Theoretisch soll letzteres 4,4 % des ersteren betragen, entsprechend dem natürlichen Gehalt von S-34 im Schwefel. Bei den in Abb. 8 festgehaltenen Chromatogrammen handelt es sich um die Analyse von Urin-Proben, die 40 h nach Einnahme von 4 mg Amphetamin (oberes Chromatogramm) bzw. 2 mg Methyldamphetamin (unteres Chromatogramm) gesammelt wurden. Wir haben je 20 ml Urin folgendermaßen analysiert: Zusatz von Carbonat und Extraktion mit Äther. Zusatz von Schwefelkohlenstoff zum Äther-Extrakt. Einengen auf 1 ml und gaschromatographische Fraktionierung an einer Kolonne von SE-30, die über einen Molekularseparator nach *Ryhage* mit einem Massenspektrometer (LKB-9000) gekoppelt ist. Bei den kleinen verabreichten Dosen wäre ein FID oder ein gleichwertiges Detektionssystem nicht in der Lage, die Amphetamine zu registrieren. Mit Hilfe der massenspezifischen Detek-

⁹ Brandenberger H. und Hellbach E., *Helv. chim. Acta* 50, 958 (1967).

¹⁰ Brandenberger H., Schnyder D. und Ryhage R., in Vorbereitung.

Abbildung 8

Massenspezifische Chromatogramme von mit Schwefelkohlenstoff versetzten Urin-Extrakten



tion kann man indessen auch nach 30 h nicht nur die Einnahme von Amphetamin beweisen, sondern auch die kleine Dosis von eingenommenen Methylamphetamin anhand dessen entmethyliertem Metaboliten erfassen.

D. Im Verlaufe des vergangenen Jahres haben wir in 4 Todesfällen Chloroform gefunden. Unsere Analysendaten sind in Tab. 6 zusammengestellt. Der Fall 272/67 war ein außerordentlich

Tabelle 6

Analysendaten von vier Chloroform-Intoxikationen

Fall No.	mg CHCl ₃ /kg Material			
	174/67	272/67	24/68	111/68
Magen	—	> 50	7	68
Blut	—	> 50	4	27
Leber	1,0	—	—	—
Lunge	0,5	—	—	—
Detektor	EED MSD	FID EED	EED	FID EED
Todesursache	M? Ertrinken	M CHCl ₃	SM Ersticken	SM CHCl ₃

roher Mordfall, der Fall 111/68 ein klarer Chloroform-Selbstmord. In beiden Fällen konnte schon der FID das Chloroform aufdecken. Natürlich haben wir trotzdem auch den EED eingesetzt. Die Leiche 174/67 wurde aus einem Fluß gezogen. Tod durch Ertrinken ließ sich nachweisen. Aus äußeren Gründen lag Entführung und Mord nahe. Um die «kidnapping»-Hypothese zu stützen, war es von großer Wichtigkeit, die Spur Chloroform mit absoluter Sicherheit nachzuweisen und nicht nur als kleiner Peak des EED. Wir haben deshalb zur massenspezifischen Detektion gegriffen.

Das Massenspektrum in Tab. 7 zeigt, daß Chloroform ein intensives Fragment m/e 83 liefert, das Ion CHCl_2^+ . Mit seinen zwei Chlor-Atomen muß dieses auch in isotopen Fragmenten m/e 85 und 87 auftreten. Das Intensitätsverhältnis der 3 Isotopenfragmente ist 9:6:1. Der von uns als Chloroform angesprochene Peak lieferte denn auch bei der Fokussierung auf die Massen 83, 85 und 87 die 3 Ausschläge im verlangten Intensitäts-Verhältnis.

Tabelle 7
Massenspektrum von Chloroform

m/e	Intensität [%]
35	5,1
36	1,2
37	1,7
47	21,5
48	9,8
49	7,2
50	3,2
82	3,6
83	100,0 $\text{CH}^{35}\text{Cl}_2^+$ (9)
84	3,4
85	65,7 $\text{CH}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$ (6)
86	1,1
87	10,5 $\text{CH}^{37}\text{Cl}_2^+$ (1)
117	1,2
118	2,0 ← MG
119	1,2
120	1,9

Bei günstig gewählten Bedingungen ist es möglich, mit massenspezifischer Detektion noch 1 pg (10^{-12} g) einer organischen Verbindung in einem gaschromatographischen Eluat zu entdecken. Massenspezifische Fokussierung ist daher heute sicherlich die empfindlichste unserer Detektionsmethoden. Lediglich der EED kann in wenigen Einzelfällen mit ihr in Konkurrenz treten (hochchlorierte Verbindungen wie Tetra-chlorkohlenstoff).

In der Ausführung der multi-massenspezifischen Fokussierung ist die massenspezifische Detektion auch außerordentlich selektiv. Die Spezifität der Anzeige steigt mit der Anzahl der Ionen, die gleichzeitig registriert werden können. Wir sind heute

bereits in der Lage, 3 Ionen gleichzeitig zu erfassen. Das entspricht bei günstig gewählten Bedingungen der Aussagekraft eines vereinfachten Massenspektrums, von dem nur 3 Hauptfragmente mit ihren Intensitätsverhältnissen bekanntgegeben werden.

Ist höchste Empfindlichkeit nicht notwendig, dagegen ein Höchstmaß an Spezifität wünschenswert, so arbeitet man am besten mit einem Massenscan der einzelnen Peaks im Kolonnen-Eluat. Ein solches Vorgehen stellt allerdings bereits hohe Anforderungen an das mit dem Gaschromatographen gekoppelte Massenspektrometer, muß es doch in der Lage sein, komplette Massenspektren im Bruchteil einer Sekunde aufzunehmen. Auch diese Art der «gaschromatographischen Detektion», die wir an dieser Stelle als «konventionelle» Koppelung von Gaschromatograph mit Massenspektrometer bezeichnen wollen, weil sie von einigen Laboratorien schon seit einigen Jahren verwendet wird, setzen wir in letzter Zeit mehr und mehr ein zur gleichzeitigen Isolierung und Identifikation von unbekannten Giftstoffen, die in Vergiftungsfällen aus Körperflüssigkeiten oder Organen angereichert werden konnten.

Abbildung 9

Massenspektrum von Hydroxyzin

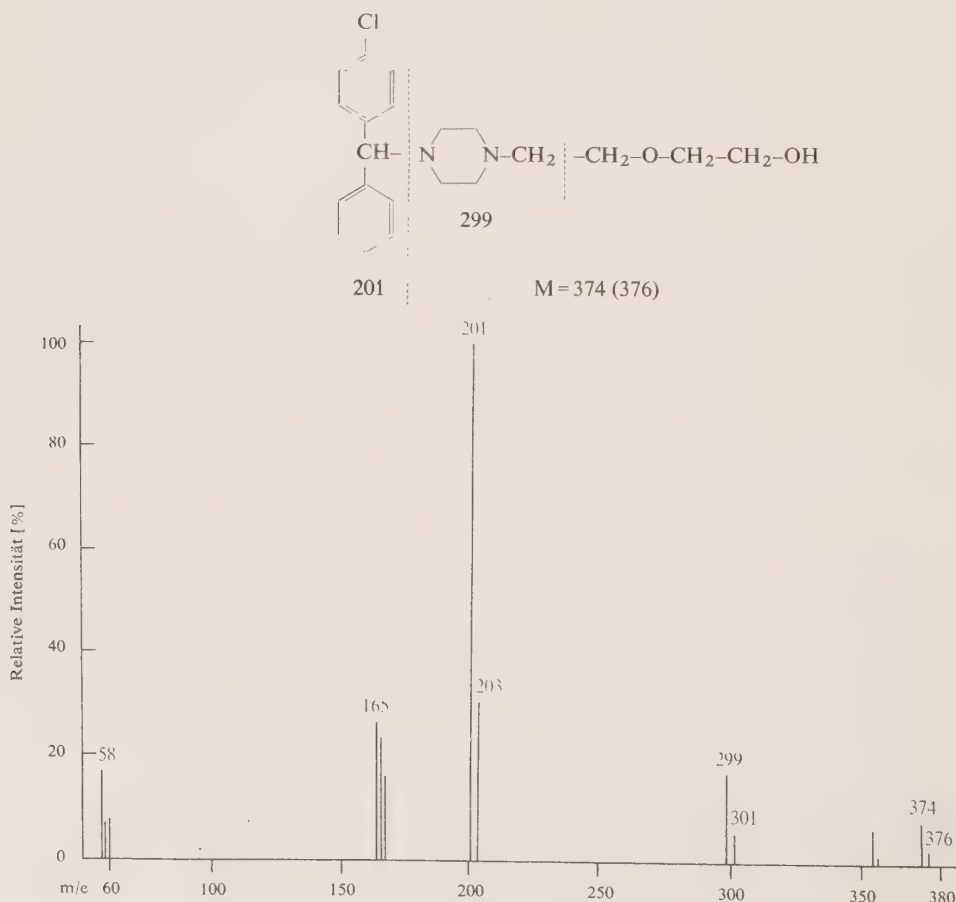


Abb. 9 zeigt das Massenspektrum einer Base, aufgenommen während des Austrittes der Verbindung aus der gaschromatographischen Trennkolonne. Das Anwendungsbeispiel stammt von einem tödlichen Luzerner Vergiftungsfall, der kürzlich in der Öffentlichkeit hohe Wellen geworfen hatte. In den untersuchten Körperflüssigkeiten ließen sich 2 Barbiturate identifizieren, nämlich die Verbindungen Seconal® und Brallobarbitol. Ferner konnten wir UV-spektrophotometrisch die Anwesenheit einer phenyl-substituierten Base sicherstellen. Deren Konstitution ließ sich durch Einsatz der kontinuierlichen Kombination von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie einwandfrei klären.

Das Massenspektrum weist auf ein Molekulargewicht von 374. Die Base muß demnach 2 (oder eine höhere gerade Anzahl) Stickstoff-Atome enthalten. Bei der Fragmentation entstehen 2 intensive Ionen mit m/e 201 und 299. Sowohl der Molekül-Peak wie auch diese beiden Fragmente sind von um 2 Masseneinheiten höheren Satellitenpeaks mit knapp 35 % ihrer Intensität begleitet. Alle 3 enthalten demnach 1 Chlor-Atom. Auch weitere Daten des Massenspektrums sowie das Ultraviolett-Spektrum waren mit dem Vorliegen des Psychopharmakons Hydroxyzin vereinbar, was durch Vergleich der Massenspektren bestätigt werden konnte.

Die Wirkstoffe Seconal®, Brallobarbitol und Hydroxyzin sind gemeinsam im Mischpräparat Vesparax® enthalten. Durch unsere Untersuchung konnte demnach sichergestellt werden, daß der Verstorbene dieses Mittel zu sich genommen hatte. Unsere quantitativen Daten wiesen auf eine hoch toxische Dosierung.

Zusammenfassung

Durch Verfolgung gaschromatographischer Trennvorgänge mit selektiven Detektoren können Spezifität und Empfindlichkeit der Analysen gewaltig gesteigert werden. Vorteile, die sich in der toxikologischen Analytik durch Kombination von Flammenionisations-Detektor mit Elektroneneinfang-Detektor und/oder Thermionic-Detektor ergeben, werden aufgezeigt und diskutiert. Ein zusätzlicher Gewinn wird erreicht durch die Einführung der massenspezifischen Detektion. Diese ist in der Lage, 1 pg (10^{-12} g) zu erfassen. Sie wird an Identifikationskraft nur übertroffen von der um Zehnerpotenzen weniger empfindlichen Koppelung Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Registrierung kompletter Massenspektren.

Résumé

La spécificité et la sensibilité des analyses toxicologiques par chromatographie en phase gazeuse peuvent être considérablement améliorées en utilisant des détecteurs sélectifs. Les avantages résultant de la combinaison d'un détecteur à flamme et d'un détecteur à capture d'électrons et/ou d'un détecteur thermionique sont décrits et discutés. L'introduction de la détection de masses spécifiques permet de décélérer jusqu'à

1 pg (10^{-12} g) de substance. La capacité d'identification de ce procédé n'est dépassée que par la combinaison chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse avec enregistrement complet des spectres de masse, dont la sensibilité est cependant bien inférieure.

Summary

Gas chromatography is an outstanding separation technique. However, if carried out in a conventional way, it lacks identification power, and – for toxicological purposes – sometimes sensitivity.

By incorporating selective detection systems, alone or in combination, specificity and sensitivity can be greatly increased. The advantages obtained by combining flame ionisation with electron capture detection in the analysis of hypnotics and related sedatives are described, as well as the role of electron capture and thermionic detector combination in the search for pesticides.

A further increase in identification power is obtained by turning to mass specific detection. The possibilities of such an approach are outlined and illustrated with recently developed procedures for the toxicological analysis of amphetamines and by the identification of minute traces of chloroform in biological specimens. Down to 1 pg (10^{-12} g) of an organic compound can be detected. The selectivity of the method is only surpassed by the use of combined gas chromatography-mass spectrometry with complete mass scans of the eluted peaks.

Adresse des Auteurs: PD Dr. H. Brandenberger, Gerichtlich-Medizinisches Institut der Universität Zürich, Chemische Abteilung, Zürichbergstraße 8, CH-8028 Zürich.

